

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



École Nationale Polytechnique d'Alger  
Département du Génie de l'Environnement

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Présenté par :

**Monsieur DELLECI Med Bachir**

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT EN  
GENIE DE L'ENVIRONNEMENT**

**THÈME**

**Effet du stress physiologique sur une micro-algue productrice  
de biogaz**

**Soutenu le : 14/09/2011 devant le jury suivant :**

<b>Présidente :</b>	<b>Mme. N. ABDI</b>	<b>Professeur à l'ENP</b>
<b>Promoteurs :</b>	<b>Mr. R. BOUARAB</b> <b>Mr. M. AINAS</b>	<b>Professeur à l'ENP</b> <b>Chargé de cours à Médéa</b>
<b>Examineur:</b>	<b>Mr. N. MAMERI</b>	<b>Professeur à l'ENP</b>

**PROMOTION 2010/2011**

# Remerciements :

En préambule à cette thèse, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Bouarab, Rabeh professeur à l'ENP, et Monsieur Ainas, Mahfoud chargé de cours à l'Université de Médéa, qui en tant que Directeurs de thèse, sont toujours montrés à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de cette thèse, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer et sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

Que Madame Abdi, Nadia professeur à l'ENP, trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la présidence du Jury.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur Mameri, Nabil professeur à l'ENP, qui a bien voulu juger mon travail et m'honorer de sa participation dans le Jury.

Je remercie également toute ma famille qui m'a soutenu et a participé de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse, merci papa pour tes sacrifices et précieux conseils, grand-mère pour ta sagesse, et maman pour ta tendresse.

Je ne saurais terminer sans remercier tous mes amis pour la bonne ambiance qu'ils ont su créer et les idées fructueuses que nous avons échangées, merci à Yakin et Célia mes binôme et examinatrice virtuel, Nadia, Nazim, Zaki, Hamid, Mehdi, Imad, Walid, Djihed, Sofiane et Nadir.

# Dédicace :

En toute humilité et avec une tendresse toute particulière, je dédie ce travail à la mémoire de ma chère tante, et mon grand-père que je n'ai pas eu la chance de connaître.

# Sommaire

Introduction générale: .....	1
CHAPITRE I Généralités sur la spiruline .....	3
I.1. La Spiruline : Taxonomie et Morphologie.....	4
I.1.1. La position taxonomique de la spiruline : .....	4
I.1.2. Les caractères morphologique de la spiruline : .....	4
I.1.3. Les caractères de biotope : .....	8
I.2. La spiruline et les vertus naturelles :.....	9
I.2.1. La valeur nutritionnelle : .....	9
I.2.2. Les bienfaits de la spiruline :.....	10
I.2.3. Croissance : .....	11
I.3. Les milieux de cultures favorables à la croissance de la spiruline : .....	13
1) Température: .....	13
2) pH optimum : .....	13
3) les oligo-éléments :.....	13
Chapitre II Les sources d'énergie et leurs voies de production. ....	15
Les sources d'énergie et leurs voies de production :.....	15
II.1. Utilisation de l'énergie: .....	16
II.1.1. Les énergies fossiles : .....	16
II.1.1.1. Utilisation de l'hydrogène :.....	16
II.1.1.2. Les modes de production d'hydrogène : .....	17
II.1.1.3. Stockage de l'hydrogène : .....	20
II.1.2. Le bio-hydrogène:.....	20
II.1.2.1. La bio-photolyse directe:.....	21
II.1.2.2. La biophotolyse indirecte: .....	21
II.1.2.3. La photo-fermentation : .....	22
II.1.2.4. La fermentation à l'obscurité : .....	23
II.2.2. Avantages et Inconvénients des Voies Métaboliques de Production d'Hydrogène : .....	24
II.2.3. Les biocatalyseurs d'hydrogene:.....	25
II.2.3.1. L'hydrogénase:.....	25

II.2.3.2. La nitrogénase : .....	27
CHAPITRE III Matériels et méthodes .....	28
III.1. La souche: .....	29
III.2. Milieu de culture : .....	29
III.3. Les conditions de croissance de la souche de spiruline : .....	30
III.4. Le spectre d'absorption : .....	31
III.5. La courbe étalon : .....	31
III.6. Contrôle de la contamination de la souche : .....	31
III.7. Production d'hydrogène en présence de lumière : .....	32
III.8. Production d'hydrogène à l'obscurité : .....	33
III.9. Effet de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène : .....	33
III.10. Effet de la concentration en NaCl sur la production d'hydrogène : .....	33
III.11. Effet de la température sur la production d'hydrogène : .....	34
III.12. Effet du pH sur la production d'hydrogène : .....	34
III.13. Effet de la concentration en bicarbonate de sodium sur la production d'hydrogène : ..	34
CHAPITRE IV Résultats et discussions .....	35
IV.1. La courbe étalon: .....	36
IV.2. Observation au microscope optique : .....	37
IV.3. Influence de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène : .....	37
IV.4. Influence de la concentration en NaCl sur la production d'hydrogène : .....	38
IV.5. Influence de la température sur la production d'hydrogène : .....	39
IV.6. Influence du pH sur la production d'hydrogène : .....	40
IV.7. Influence de la concentration en NaHCO <sub>3</sub> sur la production d'hydrogène : .....	41
Conclusion générale .....	43
Références bibliographiques .....	45
Annexe .....	50

# Liste des figures

Figure I. 1. <i>Spirulina platensis</i> observée au microscope [3].	6
Figure I. 2. Filaments des deux espèces de spiruline observées au microscope optique [3].	6
Figure I. 3. Ultra structure d'une cyanobactérie.	7
Figure I. 4. Composition de 100g de Spiruline [8].	10
Figure I. 5. Les étapes membranaires du processus de photosynthèse se déroulant chez les plantes vertes, les algues et les cyanobactéries [15].	11
Figure I. 6. Représentation de l'équilibre entre les réactions de photosynthèse et de respiration chez les organismes photosynthétiques [14].	12
Figure I. 7. Photographies représentant différentes souches de spirulines [18].	14
Figure II. 1. Schéma de principe du vaporeformage [24].	18
Figure II. 2. La bio photolyse directe [30].	21
Figure II. 3. La bio-photolyse indirecte [30].	22
Figure II. 4. La photo-fermentation [30].	23
Figure II. 5. Hydrogène produit par fermentation à l'obscurité [30].	24
Figure II. 6. Structure moléculaire des hydrogénases à fer (gauche) et à nickel-fer (droite). [36].	26
Figure III. 1. Schéma explicatif de la récupération du biogaz.	32
Figure III. 2. Le transfert des électrons jusqu'à l'hydrogénase [37].	33
Figure IV. 1. Courbe étalon mettant en relief la relation entre la densité optique et le poids sec de la souche.	36
Figure IV. 2. Production d'hydrogène en fonction de l'âge de la souche de spiruline.	37
Figure IV. 3. Production d'hydrogène en fermentation et en photo-fermentation en fonction de la concentration du NaCl.	38
Figure IV. 4. Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la température.	39
Figure IV. 5. Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction du pH.	40
Figure IV. 6. Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la concentration en NaHCO <sub>3</sub> .	41

# Liste des Tableaux

Tableau I. 1. <i>Description de plusieurs variétés d'Arthrospira platensis, selon l'endroit où elles poussent naturellement [5].</i> .....	5
Tableau I. 2. <i>Sites géographiques où pousse naturellement la spiruline [5].</i> .....	8
Tableau II. 1. <i>Avantages et inconvénients des différents processus biologiques pour la production d'hydrogène [34].</i> .....	25
Tableau III. 1. <i>Composition chimique du milieu Zarrouk.</i> .....	29
Tableau III. 2. <i>Composition chimique de la solution A<sub>5</sub>.</i> .....	30
Tableau III. 3. <i>Composition chimique de la solution B<sub>6</sub>.</i> .....	30

# Annexes

<b>Annexe 1.</b> <i>Limites de concentrations dans le milieu de culture [7].</i> .....	51
--	----

## **Introduction générale:**

Dans le domaine énergétique, le recours aux énergies d'origine fossile est très largement prépondérant dans tous les secteurs d'activité, et en particulier dans les transports. Bien qu'utilisées depuis des siècles auparavant, au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, les combustibles fossiles ont permis un progrès industriel considérable dans certaines régions du monde. En effet, leur facilité de manipulation, de transport et de stockage leur a permis de gagner du terrain.

Selon l'Agence Internationale de l'Énergie (AIE), la demande mondiale en pétrole (hors biocarburants) devrait s'accroître de 1 % par an en moyenne, passant ainsi de 85 à 106 millions de barils par jour entre 2007 et 2030.

Même si le constat de raréfaction de ces énergies fossiles est bel et bien réel, il existe l'alternative hydrogène. Son principal atout est que sa combustion ne génère que de l'eau. Bien plus, l'utilisation de l'hydrogène permet de résoudre une partie du défi écologique de ce début de siècle.

De nos jours, les productions industrielles de masse de l'hydrogène sont génératrices de gaz à effet de serre. Cependant, l'alternative aux hydrocarbures n'est satisfaisante que si la production d'hydrogène elle-même intègre la conversion d'une énergie renouvelable. Et un coût de production réaliste.

L'objectif de ce travail consiste à produire de l'hydrogène par voie biologique en utilisant une micro-algue « la spiruline » en optimisant les paramètres pouvant influencer cette production: tel que l'âge de la souche, le pH du milieu, la température, la concentration en NaCl, le mode de production,...

Ce document comporte quatre chapitres. Le premier est consacré à des généralités sur la spiruline, son type trophique, sa morphologie et ses vertus naturelles.

Le second chapitre porte sur les sources d'énergies fossiles, ainsi que sur les modes de production d'hydrogène biologique et non biologique.

Le troisième chapitre présente la souche utilisée et les conditions de travail au sens du laboratoire de biotechnologie et génie des procédés, et aussi les paramètres étudiés pour la production du biogaz.



Le quatrième chapitre illustre les résultats obtenus et leurs interprétations. Il est suivi d'une conclusion générale.

# **CHAPITRE I**

## **Généralités sur la spiruline**

## **I.1. La Spiruline : Taxonomie et Morphologie**

### **I.1.1. La position taxonomique de la spiruline :**

La spiruline n'est ni végétale ni animale. Elle est classée parmi les cyanobactéries [1]. Ce groupe comprend l'ensemble des bactéries autotrophes, c'est-à-dire capables d'utiliser l'énergie de la lumière pour la photosynthèse [2].

Mais, contrairement aux algues et aux plantes également dotées de ce pouvoir photosynthétique, elle appartient à l'embranchement des procaryotes (noyau primaire), car elle n'a pas de noyau bien individualisé.

D'un point de vue taxonomique, elle appartient à l'ordre des *Nostocales*, à la famille des *Oscillatoriaceae* et au genre *Arthrospira* [3, 4].

Actuellement, 50 souches d'*Arthrospira* recensées à travers le monde ont été étudiées pour en décrire la diversité génétique. C'est l'association Antenna Technologies qui, en collaboration avec l'université de Genève, a récemment effectué ce travail de classification de différentes souches d'*Arthrospira*. Celui-ci repose sur le séquençage génétique d'un fragment d'ADN hypervariable, mais spécifique des cyanobactéries. Il en ressort une très forte homogénéité du genre *Arthrospira*, même lorsque les souches ont des morphologies variées ou lorsqu'elles proviennent de lieux géographiques très différents. Leur conclusion est qu'il n'existerait a priori que deux espèces génétiquement différentes parmi ces souches [3]. Ces deux espèces sont : *Arthrospira platensis*, initialement originaire du Kanem (Tchad) et *Arthrospira geitleri* ou *maxima*, originaire du lac Texcoco (Mexique). (figure 2) [3].

En pratique, il faut retenir que le terme "Spiruline" correspond au nom commercial d'une espèce de cyanobactérie alimentaire appartenant toujours au genre *Arthrospira*.

Le mot "Spirulina" est le nom commercial anglophone de la spiruline, mais il désigne également un genre de cyanobactérie assez éloigné d'*Arthrospira*, et surtout non comestible (par exemple : *Spirulina major*, *Spirulina subtilissima*, *Spirulina princeps*, *Spirulina gigantea* ou *Spirulina subsalsa*) [5].

### **I.1.2. Les caractères morphologique de la spiruline :**

La spiruline se présente sous la forme d'un filament pluricellulaire bleu-vert, mobile par glissement, non ramifié et enroulé en spirale. Ce filament, de forme hélicoïdale, appelé trichome est observable uniquement en milieu liquide. C'est d'ailleurs de là que la spiruline tient son nom. La longueur moyenne du filament est de 250  $\mu$  m lorsqu'il a 7 spires et son diamètre est d'environ 10  $\mu$  m. Mais les paramètres de l'hélice (épaisseur,

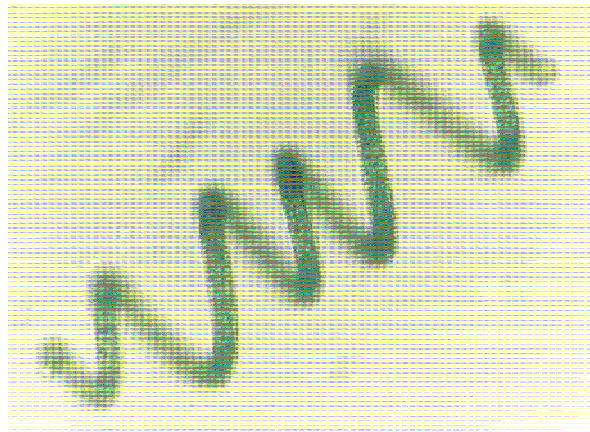
longueur) ne sont pas toujours les mêmes selon les chercheurs qui étudient la spiruline. Parfois, les spires au centre du filament sont plus rapprochées qu'aux extrémités et la forme générale peut-être celle d'un diabololo, avec un diamètre de spire plus petit au centre et aux extrémités.

Le genre *Arthrospira* a été retrouvé en maints endroits dans le monde et, il a été constaté une grande variation dans la taille et la forme des trichomes (tableau I).

**Tableau I. 1.** Description de plusieurs variétés d'*Arthrospira platensis*, selon l'endroit où elles poussent naturellement [5].

Date	Auteur et lieu	Longueur des cellules ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre des cellules ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre des spires ( $\mu\text{m}$ )	Distance entre les spires ( $\mu\text{m}$ )
1980	R. Fox Lac Orovilca	2,5	7,8	36	95
1984	S. Pargaonkar Lac Lonar	4,5	12	99	55
1990	H. Durand-Chastel Lac Cratère	3,2	12,45	52,3	52
1993	G. Planchon Paracas	2,4	9,5	33	43
1994	G. Planchon Camargue	2,3	11,6	44	109
1994	K. Nguyen Toliara	3,8	7,2	21,2	32,5
1994	G. Knutsen Olive Mill	2,6	6,1	32	65

***Spirulina platensis*** (figure 1) est la plus connue et la plus utilisée lors des travaux de recherche ou lors de l'ensemencement de nouvelles cultures. Elle se compose de trichomes atteignant 350  $\mu\text{m}$  de long et entre 6 et 12,45  $\mu\text{m}$  de diamètre ; ils sont un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de (20 à 50)  $\mu\text{m}$ , diminuant légèrement vers les extrémités [5].



**Figure I. 1.** *Spirulina platensis* observée au microscope [3].

**Spirulina maxima** : Se caractérise par des trichomes de 70 à 80  $\mu$  m de long, de 7 à 9  $\mu$  m de diamètre et légèrement effilés aux extrémités. Ils forment une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60  $\mu$  m de diamètre. Les cellules constituant les trichomes mesurent entre 5 et 7  $\mu$  m de long et ne rétrécissent pas au niveau des articulations [5].



**Figure I. 2.** Filaments des deux espèces de spiruline observées au microscope optique [3].

En ce qui concerne les différentes souches (ou variétés) de spirulines, on distingue les spirulines "spirales", "ondulées" et "droites". Le terme "spirales" désigne les souches dont les filaments ont la forme d'une queue de cochon, telle la "Lonar" (Inde); le terme "ondulées" désigne les souches dont les filaments sont en spirale étirée, telle la "Paracas" (Pérou); Alors

que le terme "droites" désigne les souches dont les filaments sont tellement étirés qu'ils donnent l'impression d'être presque rectilignes.

La microscopie électronique a aussi permis de mieux connaître la structure et le fonctionnement de ces cellules. Leur organisation est relativement simple et semblable à celle des cellules de procaryotes [1, 6]:

- Absence de membrane nucléaire et donc de noyau bien individualisé (Absence de mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, et flagelles),
- Sur le plan ultra structural, le chromoplasma apparaît comme un système membranaire comprenant des thylakoïdes (sites de photosynthèse),
- Les granules d'amidon cyanophycéen (glycogène), constituent des formes de réserve énergétiques,
- Les ribosomes riches en acide ribonucléique,
- Les vésicules de gaz: se présentent sous forme de faisceaux de minuscules cylindres contenant de l'azote. Leur rôle est de réguler la flottabilité des filaments de spiruline [3].

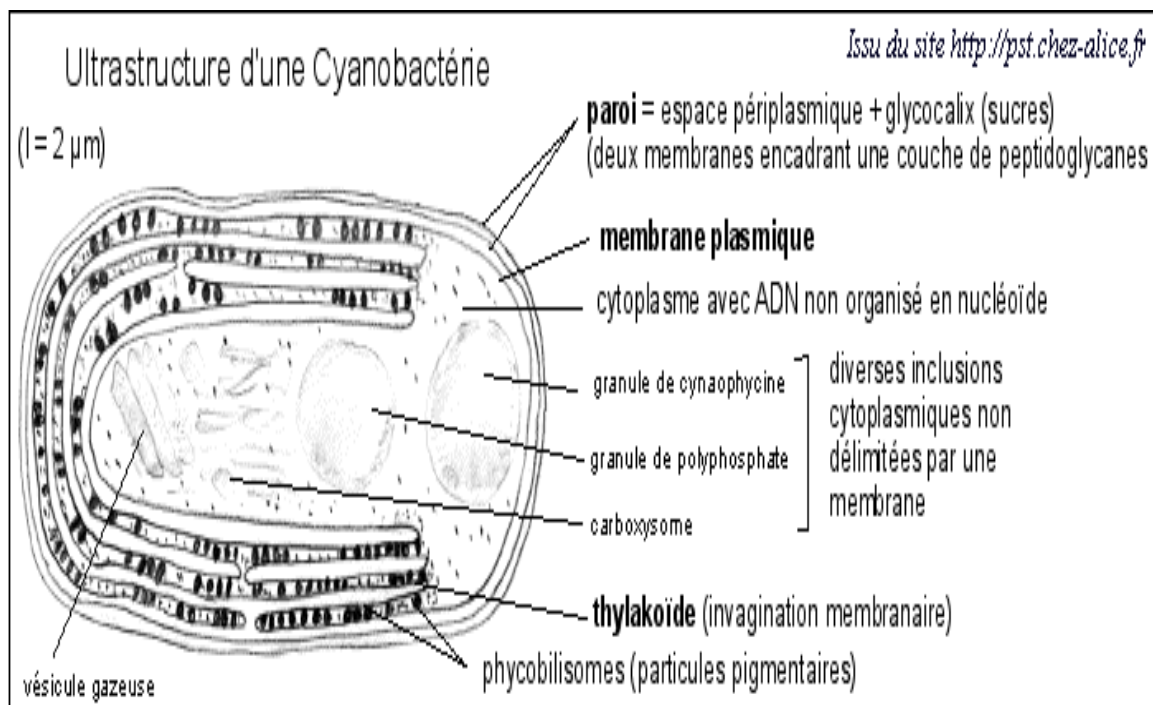


Figure I. 3. Ultra structure d'une cyanobactérie.

### **I.1.3. Les caractères de biotope :**

Ce qui distingue le genre *Arthrospira* des autres cyanobactéries, c'est le milieu naturel où elles vivent. En effet, les spirulines prolifèrent dans des eaux très minéralisées, extrêmement alcalines et chaudes. Ces conditions environnementales très contraignantes excluent la plupart des autres êtres vivants [5] (Tableau I.2).

D'autre part, le flamant rose nain, *Phoeniconaias minor*, a joué dans le passé un rôle de vecteur aérien pour la spiruline [7], laquelle a ainsi pu coloniser progressivement de nouveaux habitats. En effet, les flamants ont pour habitude de voler sur de longues distances pour rechercher de la nourriture. Or, la spiruline s'accrochant aux écailles de leurs pattes et à leurs plumes, elle s'est trouvée ainsi transportée dans d'autres lacs alcalins où elle a pu proliférer [7].

**Tableau I. 2.** Sites géographiques où pousse naturellement la spiruline [5].

Noms des pays	Localisations précises
	<b>AFRIQUE</b>
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du Kanem : lacs Latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom, Ounianga kebir
Soudan	Cratère de Djebel Marra
Djibouti	Lac Abber
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu,
Congo	Navasha, Rodolphe Mougounga
Kenya	Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron
Tanzanie	Lac Natron
Tunisie	Lac Tunis; Chott el Jerid
Zambie	Lac Bangweoulou
Madagascar	Beaucoup de petits lacs près de Toliara

	<b>ASIE</b>
Inde	Lacs Lonar et Nagpur, réservoir près de Madurai
Myanmar	Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank
Sri Lanka	Lac Beira
Pakistan	Mares près de Lahore
Thaïlande	Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de
	<b>AMERIQUE du SUD</b>
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas Près de l'Ile d'Amantani dans le lac Titicaca
Mexique	Lac Texcoco ; Lac Cratère
Uruguay	Montevideo
Equateur	Lac volcanique Quilotoa : cratère de 1km de diamètre
	<b>AMERIQUE du NORD</b>
Californie	Oakland ; Del Mar Beach
Haïti	Lac Gonâve
Rép. Dominicaine	Lac Enriquillo
	<b>EUROPE</b>
France	Camargue

## I.2. La spiruline et les vertus naturelles :

### I.2.1. La valeur nutritionnelle :

Lorsque les Européens entrèrent en Amérique centrale, ils découvrirent que les Aztèques tiraient du grand lac Tex Coco, situé près de Mexico, une sorte de « boue » bleue à haute valeur nutritive, en l'occurrence le *tecuitlatl* ou **spiruline**. En Afrique, certaines peuplades du Sahara récoltent depuis très longtemps, dans le lac du Tchad, une substance semblable, le **Dihé**, qui est notamment consommée par les femmes enceintes et durant les périodes de pénurie alimentaire. Sa forte teneur en protéines qui est de l'ordre de 60%, sa richesse en acides aminés, en minéraux tels que le fer et le magnésium et en vitamines A et B<sub>12</sub> fait d'elle



un bon candidat pour un complément alimentaire de haute qualité, capable ainsi de résoudre une grande partie des problèmes de malnutrition et de santé [5] (Figure I.4).

<b>COMPOSITION DE 100g de SPIRULINE</b>		
<b>Protéines</b>		<b>50 à 70 g</b>
<b>Glucides</b>		<b>15 à 25 g</b>
<b>Lipides</b>		<b>6 g</b>
<b>Minéraux :</b>		
Calcium		770 mg
Phosphore		780 mg
Magnésium		250 mg
Sodium		450 mg
Potassium		1100 mg
Fer		120 mg
Zinc		3 mg
Manganèse		3 mg
<b>Vitamines :</b>		
Béta-carotène	A	130 mg
Thiamine	B1	5 mg
Riboflavine	B2	4 mg
Niacine	B3	13 mg
Pantothénate de calcium	B5	2 mg
Pyridoxine	B6	0,7 mg
Inositol	B7	35 mg
Biotine	B8	0,01 mg
Folate	B9	0,05 mg
Cyanocobalamine	B12	0,2 mg
Tocophérol	E	20 mg

\* Ces valeurs sont données à titre indicatif et sont susceptibles de varier en raison du caractère naturel du produit. Nous indiquons ici les valeurs moyennes généralement observées

**Figure I. 4** Composition de 100g de Spiruline [8].

### **I.2.2. Les bienfaits de la spiruline :**

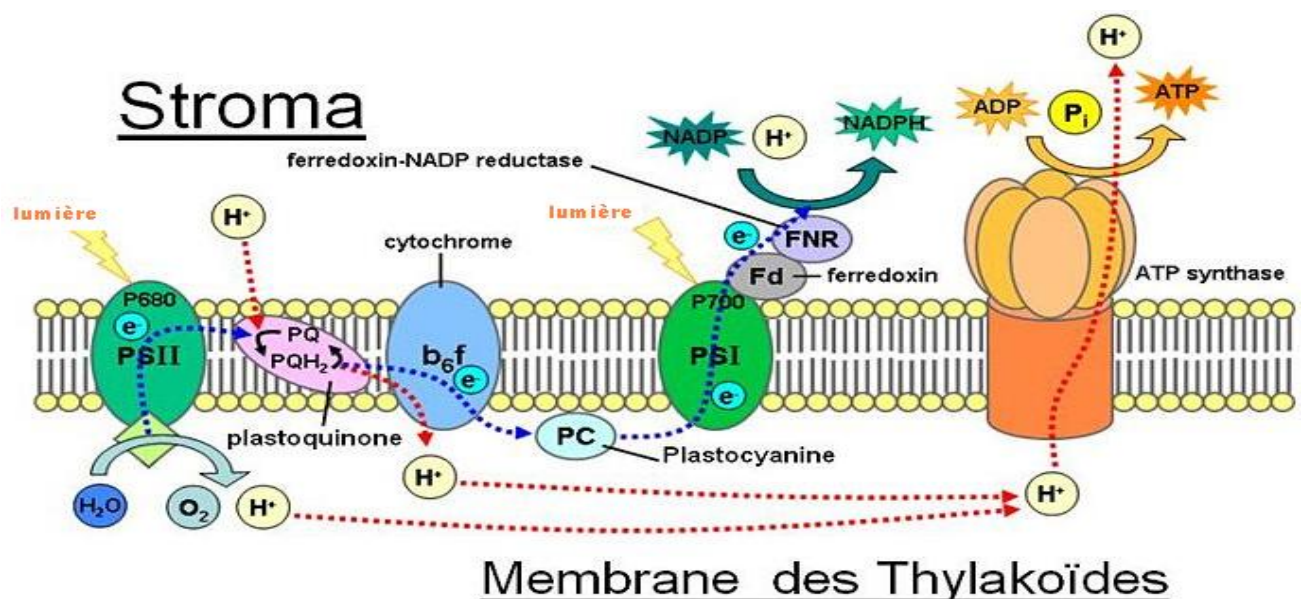
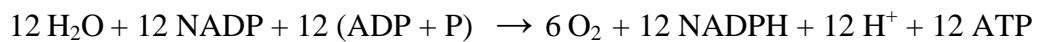
Parmi les principaux bienfaits, on cite [9] :

- La spiruline peut aider naturellement à avoir un bon système immunitaire,
- Elle permet de ralentir le phénomène de vieillissement,
- La spiruline a une action de stimulation de la production de lactobacilles (micro-organismes qui améliorent la digestion et également l'absorption intestinale),...

### I.2.3. Croissance :

Grâce à ses pigments chlorophylliens, la spiruline est une espèce photo- autolitotrophe aérobie. Elle est dotée des photosystèmes I et II [10]. Chez la spiruline, la photosynthèse constituant la clé de sa croissance. Pour sa photosynthèse, la spiruline a besoin d'eau, de carbone, et d'éléments nutritifs dont l'azote en particulier. Elle assimile une source de carbone minéral (le CO<sub>2</sub> atmosphérique) et la convertit en énergie biochimiquement utilisable (représentée par le glucose). Par ailleurs, l'énergie lumineuse est captée par des pigments assimilateurs représentés par les chlorophylles. Dans le cas de la spiruline et des autres bactéries photosynthétiques, la chlorophylle se situe dans les régions spécialisées de leur membrane cellulaire: les phycobilisomes des thylakoïdes. Les thylakoïdes contiennent des pigments photosynthétiques organisés en deux photosystèmes: les photosystèmes I et II, respectivement notés PS I et PS II. Ils sont toujours placés à proximité l'un de l'autre [11, 12]. Le PS I possède une plus grande variété de pigments que le PS II qui est plus riche en chlorophylle de type a P680. C'est à son niveau que se produit la photolyse de l'eau, c'est-à-dire qu'il récupère les électrons libérés par les molécules d'eau (Figure I.5).

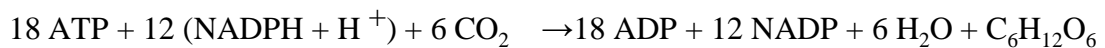
Au cours de cette phase lumineuse, il y a photolyse de l'eau: les molécules d'oxygène et d'hydrogène se séparent. On assiste également à la synthèse d'ATP (Adénosine-Tri-Phosphate), molécule dont la consommation libère beaucoup d'énergie et de NADP (Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate) [13, 14]:



**Figure I. 5.** Les étapes membranaires du processus de photosynthèse se déroulant chez les plantes vertes, les algues et les cyanobactéries [15].

Les réactions obscures ont lieu dans le stroma (matrice) du thylakoïde, où l'énergie produite lors de la phase lumineuse y est stockée sous forme d'ATP et de NADP réduit. Cette énergie est utilisée pour la synthèse de molécules organiques, par réduction du dioxyde de carbone.

Cette phase est dite obscure car elle correspond à une série de réactions qui ne nécessitent pas de lumière; ce n'est pas pour autant qu'elles se déroulent la nuit. Au contraire. Ces réactions forment le cycle de Calvin, à l'issue duquel, une molécule de glucose est synthétisée [16]:



La formule générale de la photosynthèse peut donc s'écrire de la façon suivante:



Durant la nuit, c'est la respiration qui permet à la spiruline de produire l'énergie nécessaire à son entretien et à sa croissance. Les hydrates de carbone produits pendant le jour, subissent une oxydation qui les convertit en protéines, avec en parallèle une formation de  $\text{CO}_2$  (lequel reste dissous dans le milieu de culture) et d'  $\text{H}_2\text{O}$  [5]. Puis, avec le retour de la lumière du jour, le  $\text{CO}_2$  participera à un nouveau cycle de photosynthèse.

Comme le montre la figure 6, la photosynthèse et la respiration s'équilibrent globalement.

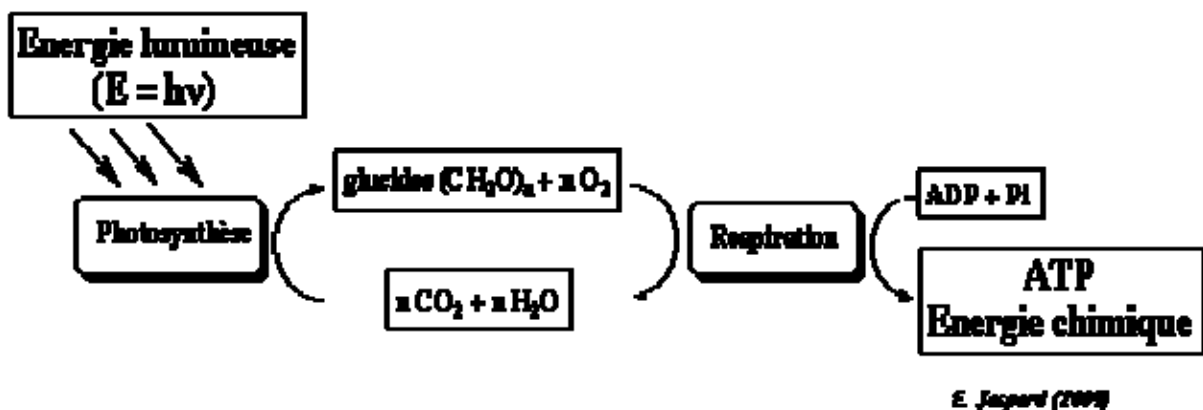


Figure I. 6. Représentation de l'équilibre entre les réactions de photosynthèse et de respiration chez les organismes photosynthétiques [14].

### **I.3. Les milieux de cultures favorables à la croissance de la spiruline :**

Plusieurs milieux de culture sont utilisés pour la croissance de la spiruline, ils diffèrent entre eux par la nature du produit chimique utilisé. Par exemple, on peut utiliser du bicarbonate naturel American, le natron, la lessive de cendres de bois, l'acide phosphorique extrait de la poudre d'os calcinés.

A noter qu'il faut respecter les limites de concentrations dans le milieu de culture à ne pas dépasser comme cité dans l'annexe 1. [7]

Voyons maintenant les paramètres physico-chimiques d'un milieu de culture et les stressés physiologique :

#### **1) Température:**

Les premiers repères concernant les températures sont à peu près les mêmes que pour l'homme, 37°C. Au-dessus, c'est trop chaud (43°C peut être mortel). En dessous, la vitesse de multiplication baisse avec la température. A 20°C, la croissance est pratiquement stoppée. La température du milieu de culture doit donc se situer entre ces deux températures [17].

#### **2) pH optimum :**

Le pH optimum d'un milieu de culture neuf à confectionner, dépend de son utilisation. S'il doit être inséminé pour démarrer une nouvelle culture, son pH doit être d'au moins 9. S'il est trop bas, la culture risque de mal démarrer, avec formation de grumeaux ou précipitation de la spiruline au fond. Le natron, le mélange carbonate/bicarbonate, ou l'eau de cendre carbonatée sont donc bien adaptés à ce cas.

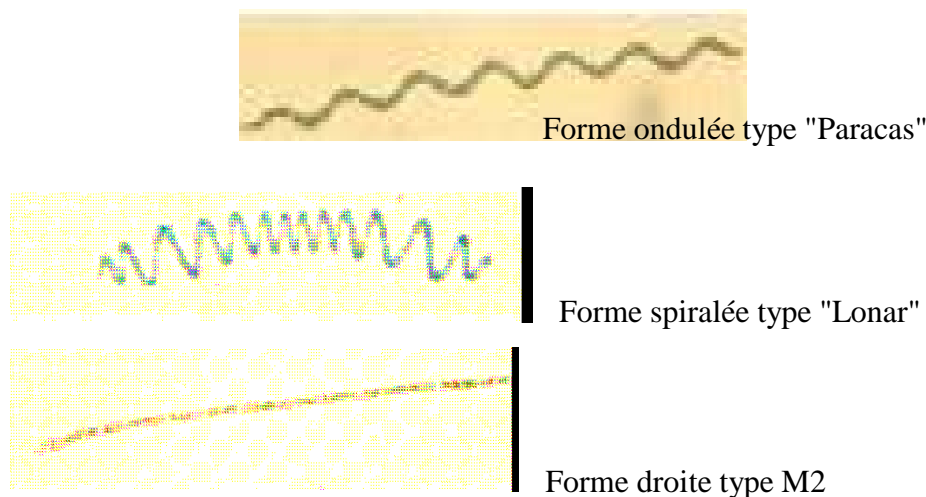
Par contre, si le milieu neuf doit servir d'appoint à une culture existante son pH peut être avantageusement voisin de 8. Ce qui contribue à maintenir le pH de la culture suffisamment bas par apport de bicarbonate. C'est typiquement le cas des bassins en cours d'extension "à géométrie variable". Dans ce cas le milieu doit être à base de bicarbonate seul. Si le milieu est à bas pH, on pourra plus facilement utiliser du NPK [17].

#### **3) les oligo-éléments :**

Au lieu de compter sur l'eau d'appoint et les sels pour apporter les oligo-éléments nécessaires à la croissance de la spiruline, il peut être plus sûr et même plus économique de les apporter par une solution concentrée toute prête (de coût très faible). L'ajout d'oligo-éléments semble un facteur positif pour assurer une bonne récolte de manière habituelle.

Parmi ces éléments, les plus importants [5]:

- Le potassium et le sodium qui interviennent dans la régulation de la pression osmotique (un mécanisme de pompe ionique qui maintient la concentration du potassium dans la cellule plus élevée que celle du sodium),
- Le phosphore est un composant de la molécule NADP<sup>+</sup> (accepteur d'énergie dans la photosynthèse),
- Le calcium intervient dans la synthèse des protéines à partir des nitrates,
- Le manganèse est un donneur d'électrons à la base de l'échelle d'énergie dans la photosynthèse,...
- Le sodium est un activateur d'enzymes aussi, Cuivre, zinc, molybdène, cobalt et d'autres oligo-éléments sont inclus dans les vitamines et les enzymes qui, comme chez l'être humain, permettent l'édification et l'entretien de molécules essentielles, leur incorporation dans des structures spécialisées des cellules [5].



**Figure I. 7.** Photographies représentant différentes souches de spirulines [18].

## **Chapitre II.**

# **Les sources d'énergie et leurs voies de production :**

## **II.1. Utilisation de l'énergie:**

### **II.1.1. Les énergies fossiles :**

L'énergie fossile est l'énergie produite à partir du pétrole, du charbon et du gaz naturel. La réserve de ces trois combustibles est fixe et elle s'épuise au fur et à mesure. Donc, elle est non-renouvelable, ou plus exactement, renouvelable mais pas à l'échelle humaine. En 2007, les énergies non renouvelables assuraient plus de 90% des besoins mondiaux [19]. Elles sont tirées des minerais ou des puits. Le principal atout des énergies fossiles c'est qu'elles bénéficient d'une capacité de production d'énergie par unité de volume élevée [20].

#### **II.1.1.1. Utilisation de l'hydrogène :**

Tout d'abord on va voir pourquoi l'hydrogène peut avoir le profil d'un vecteur énergétique futur.

#### **Pourquoi l'hydrogène?**

Certaines réponses à cette question relèvent autant d'un optimisme excessif que d'un pessimisme exagéré. Comme souvent dans de tels débats, la vérité se situe entre ces deux extrêmes. Elle résulte de tendances lourdes [21]:

- Explosion de la demande énergétique,
- Tarissement des ressources fossiles et réchauffement de la planète imputable à un effet de serre excessif,
- Temps relativement très long pour la régénération des ressources fossiles,
- Combustible propre.

#### **Les qualités évidentes de l'hydrogène :**

La molécule d'hydrogène est la plus énergétique:  $120 \text{ mJ.kg}^{-1}$  soit 2,4 fois le gaz naturel. L'hydrogène a un contenu énergétique de  $39,4 \text{ KWh.Kg}^{-1}$  tandis que le charbon, selon sa forme, oscille dans la fourchette de  $7,8$  à  $8,7 \text{ KWh.Kg}^{-1}$ . Soit environ 5 fois moins par unité de masse, il est ni polluant, ni toxique et sa combustion dans l'air ne génère que de l'eau [21].

#### **Les inconvénients de l'hydrogène :**

La légèreté de l'hydrogène implique, une densité énergétique volumique moins favorable au transport et au stockage sous forme gazeuse que pour le gaz naturel. Ses limites d'inflammabilité et de détonation avec de l'air sont plus larges que pour le gaz naturel, d'un facteur 5 environs. Sa combustion thermique à haute température en présence de l'air, génère

des oxydes d'azote considérés comme gaz dangereux, son image dans le public n'est pas bonne et son acceptabilité n'est donc pas encore acquise [21].

### **II.1.1.2. Les modes de production d'hydrogène :**

#### **Production d'hydrogène à partir des énergies fossiles:**

Aujourd'hui, les technologies dominantes pour la production d'hydrogène à partir des hydrocarbures sont le vaporeformage, l'oxydation partielle et le reformage auto-thermique.

Les modes cités précédemment sont les plus répandus en terme de production d'hydrogène à partir d'énergie fossiles, mais ils ne constituent pas une solution à terme puisque tout ces carburants ont une durée de vie limitée, en plus cette technique est très polluante car elle génère du CO<sub>2</sub>.

#### **Le vaporeformage d'hydrocarbures :**

Le reformage à la vapeur consiste à transformer les charges légères d'hydrocarbures en gaz de synthèse (mélange H<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>,...) par réaction avec la vapeur d'eau sur un catalyseur au nickel. Cette transformation a lieu à haute température (840 à 950) °C et à pression modérée (20 à 30 bars) [22].

Actuellement, il est principalement obtenu à partir du gaz naturel:

**Réaction (1):** production de gaz de synthèse.



**Réaction (2):** Conversion de CO en CO<sub>2</sub> (*Water Gas Shift Reaction*).



Les deux dernières étapes consistent à séparer CO<sub>2</sub> de H<sub>2</sub> puis à éliminer les dernières traces d'impuretés par PSA (Pressure Swing Adsorption) qui est la plus utilisée [23] (Figure II.1).



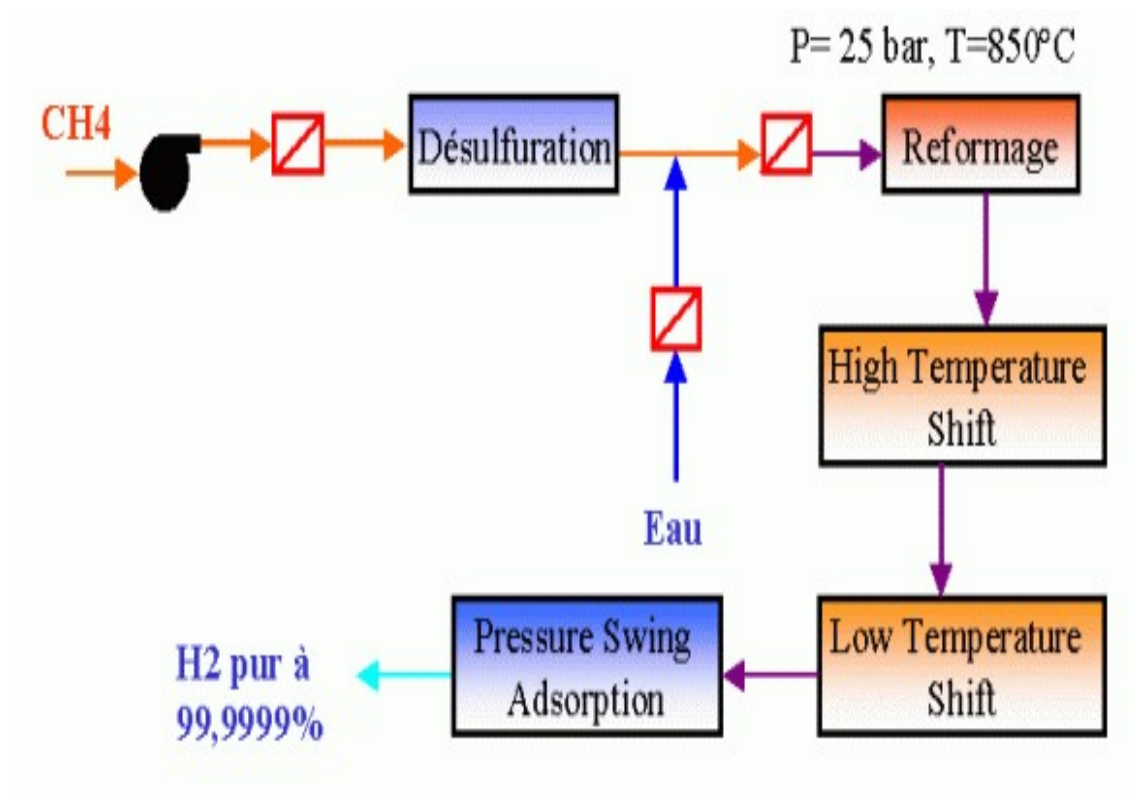
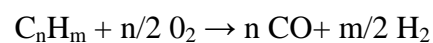


Figure II. 1. Schéma de principe du vaporeformage [24].

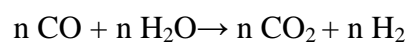
### L'oxydation partielle :

L'oxydation partielle consiste en une réaction entre un carburant (gaz naturel, hydrocarbure léger,...) avec l'oxygène [25, 26] dont les deux principales réactions sont:

**Réaction (1):** production de gaz de synthèse à une température entre  $1300$  et  $1400^\circ\text{C}$  et une pression de  $20$  à  $90$  bars:



**Réaction (2):** conversion du monoxyde de carbone:



**Le reformage auto-thermique :**

Le procédé auto-therme est une combinaison des deux précédents procédés. Il est probablement le plus intéressant des prochaines évolutions des procédés de production d'hydrogène à partir d'hydrocarbure. Son principal atout est de compenser (dans un même réacteur à lit fixe) les réactions endothermiques du vaporeformage par les réactions exothermiques de l'oxydation partielle [24]. Donc au total on n'a pas besoin d'apport de chaleur, ce procédé permet d'atteindre une très bonne efficacité.

**La gazéification du charbon :**

Cette technique permet de produire de l'électricité et des sous produits comme l'hydrogène. Son principe consiste à mélanger le charbon avec de l'eau et de l'air à 1000°C et sous haute pression afin d'obtenir un gaz contenant en majorité du CO et de l'hydrogène qu'il faudra séparer des autres impuretés [27].

**Production de l'hydrogène à partir du nucléaire :**

Une autre possibilité de production d'hydrogène réside dans le nucléaire. Depuis quelques années, des chercheurs étudient des réacteurs nucléaires dits de 4<sup>ème</sup> génération. Non seulement plus sûrs, ils permettront une moindre consommation de combustible nucléaire, une production plus faible de déchets mais également en plus de la fourniture d'électricité, la production d'hydrogène. Les rendements devraient être de l'ordre de 50 %. Aujourd'hui, une dizaine de pays travaillent sur cette innovation technologique: la France, les USA, le Japon, le Royaume-Uni, la Suisse, l'Afrique du Sud, l'Argentine, le Brésil, le Canada et la Corée du Sud. En outre, six nouvelles technologies de réacteur sont à l'étude: un réacteur refroidi avec de l'eau, un réacteur à neutrons rapides à refroidissement avec au choix sodium liquide ou alliage de plomb liquide, un réacteur à gaz à très haute température et un réacteur à sels fondus. Le CEA a choisi de retenir en particulier le réacteur à gaz à haute température (1100°C), noté VHTR [28]. Le haut niveau de température permet la décomposition de l'eau en hydrogène et en oxygène.

**Production d'hydrogène par décomposition de l'eau :**

Cette solution est la plus intéressante en terme de non émissions de gaz à effet de serre si cette dissociation se fait à partir de sources d'énergies elles-mêmes non émettrices de CO<sub>2</sub> deux procédés sont à l'étude pour cette méthode de production:

**1) L'électrolyse chimique :**

L'électrolyse de l'eau est une réaction électrochimique qui vise à séparer la molécule d'eau afin d'obtenir de l'hydrogène ainsi que de l'oxygène.

**2) Dissociation de la molécule d'eau par cycle thermochimique :**

Le principe des cycles consiste à dissocier la molécule d'eau par des réactions chimiques successives en introduisant certains composés qui sont régénérés au cours des réactions pour être réutilisés en boucle dans le procédé. La succession de réactions aboutit à la formation d'hydrogène et d'oxygène. Parmi ceux qui semblent actuellement les plus prometteurs [29], on peut citer les cycles cérium-chlore, cuivre-chlore, et bien entendu iode-soufre. Ce dernier est le plus développé et étudié

**II.1.1.3. Stockage de l'hydrogène :**

Le stockage de l'hydrogène est une étape clé de l'utilisation de ce dernier comme vecteur énergétique. Actuellement, il existe trois grandes familles de systèmes de stockage, chacune ayant des avantages et des inconvénients spécifiques lui permettant d'être intégrée, ou non, dans une application particulière :

- Le stockage d'hydrogène à haute pression allant de 200 à 700 bars,
- Le stockage cryogénique d'hydrogène liquide (- 253°C). Cette solution entraîne une dépense énergétique importante, vu que l'hydrogène est difficile à liquéfier,
- Le stockage solide d'hydrogène sous forme d'hydrure ou matériaux poreux.

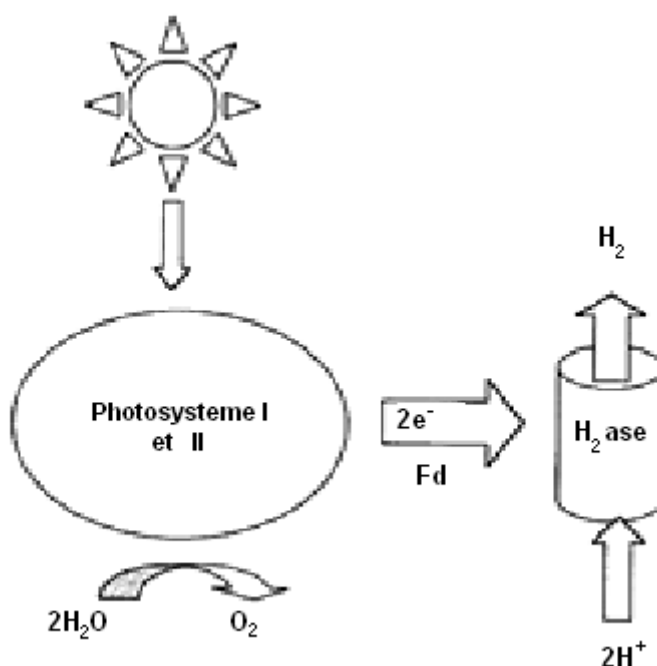
**II.1.2. Le bio-hydrogène:****Production d'hydrogène par voie biologique:**

La production biologique de l'hydrogène est définie comme le résultat du métabolisme d'un organisme vivant qui libère, dans des conditions données, de l'hydrogène gazeux comme métabolite secondaire. Cette voie de production écologique n'a besoin que de lumière solaire et d'eau et ne dégage pas de gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>). Les principaux inconvénients de cette voie est qu'elle utilise un mécanisme physiologique complexe et la production est limitée car l'hydrogénase est sensible à l'oxygène [30].

### **II.1.2.1. La bio-photolyse directe:**

Cette méthode est utilisée par l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* qui possède une hydrogénase à fer [31], qui est très sensible à l'oxygène [30]. Elle implique l'absorption de la lumière par les deux photosystèmes (PSI, PSII) pour dissocier deux molécules d'eau et libérer de l'oxygène et des électrons, qui seront utilisés soit pour réduire le CO<sub>2</sub>, soit sont eux même transportés via des porteurs (Ferrédoxine) jusqu'à une hydrogénase pour les réduire en hydrogène gazeux (Figure II. 2).

Des études de carences en soufre ont montré qu'il diminue l'activité du PSII et donc la libération d'oxygène par photolyse de l'eau. L'oxygène résiduel est alors consommé par la respiration et le milieu devient anoxique, ce qui permet la production d'hydrogène. Ainsi que la présence d'acétate qui augmente le taux de la respiration.



**Figure II. 2.** *La bio photolyse directe [30].*

### **II.2.1.2. La biophotolyse indirecte:**

Cette méthode est utilisée par les cyanobactéries et repose sur le fait de la séparation temporelle et/ou spatiale entre la production de l'oxygène et la production de l'hydrogène [30]. Dans la première phase, les conditions sont favorables à la photosynthèse pour permettre ainsi la croissance et l'accumulation des réserves. Dans une deuxième phase, il se produit une

fermentation pour le déplacement de l'oxygène produit. Et enfin, dans une dernière phase et en présence de lumière, il y a production d'hydrogène [30] (Figure II. 3).

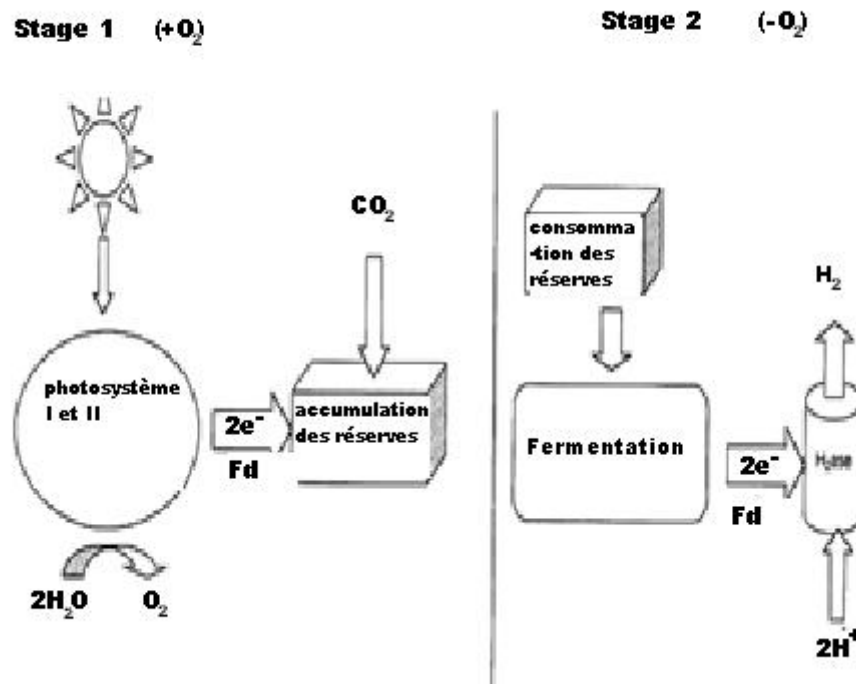


Figure II. 3. La bio-photolyse indirecte [30].

### II.2.1.3. La photo-fermentation :

Cette méthode est utilisée par les bactéries pourpres comme *Redosperillum*. Parmi ses avantages, on cite le fait que plusieurs substrats peuvent être utilisés tels que les acides organiques [32] et le manque du photosystème II responsable de la production d'oxygène qui inhibe la production d'hydrogène [30, 32].

Cette production d'hydrogène est associée à l'action de la nitrogénase, qui en absence d'azote, en condition d'anaérobie et en présence de lumière, catalyse la réduction des protons en hydrogène [33].

Mais l'inconvénient majeur de ce type de production biologique est que les micro-organismes utilisent généralement la nitrogénase pour produire de l'hydrogène, car elle nécessite de l'énergie (ATP) pour produire de l'hydrogène et de plus elle est lente comparé à l'hydrogénase NI-Fe [30, 32].

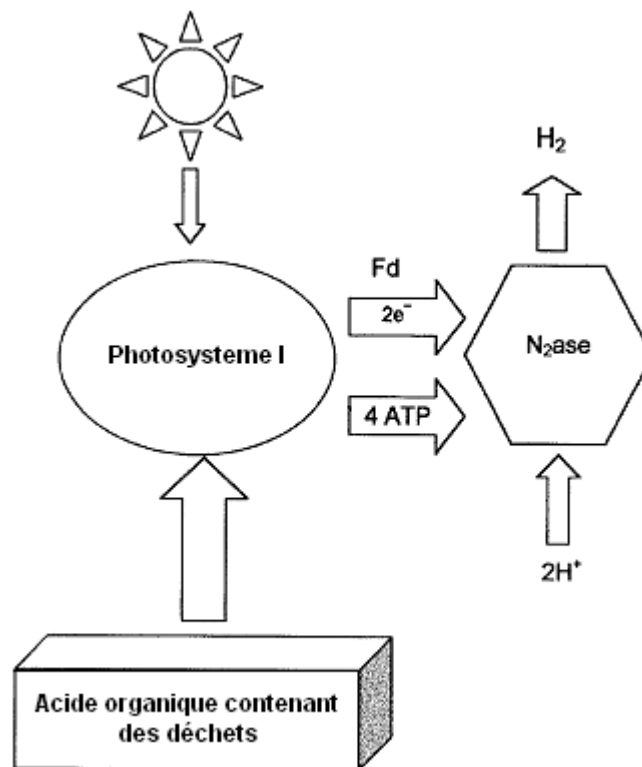


Figure II. 4. La photo-fermentation [30].

#### **II.2.1.4. La fermentation à l'obscurité :**

Cette méthode est utilisée par *Clostridium*. Elle se déroule en absence de lumière et en anaérobie strict. Théoriquement la valeur maximum d'hydrogène produite est de 4 moles par mole de glucose [32]. Ceci est une conséquence naturelle du fait que les fermentations ont été optimisées par l'évolution pour produire la biomasse cellulaire et pas l'hydrogène (Figure II.5):



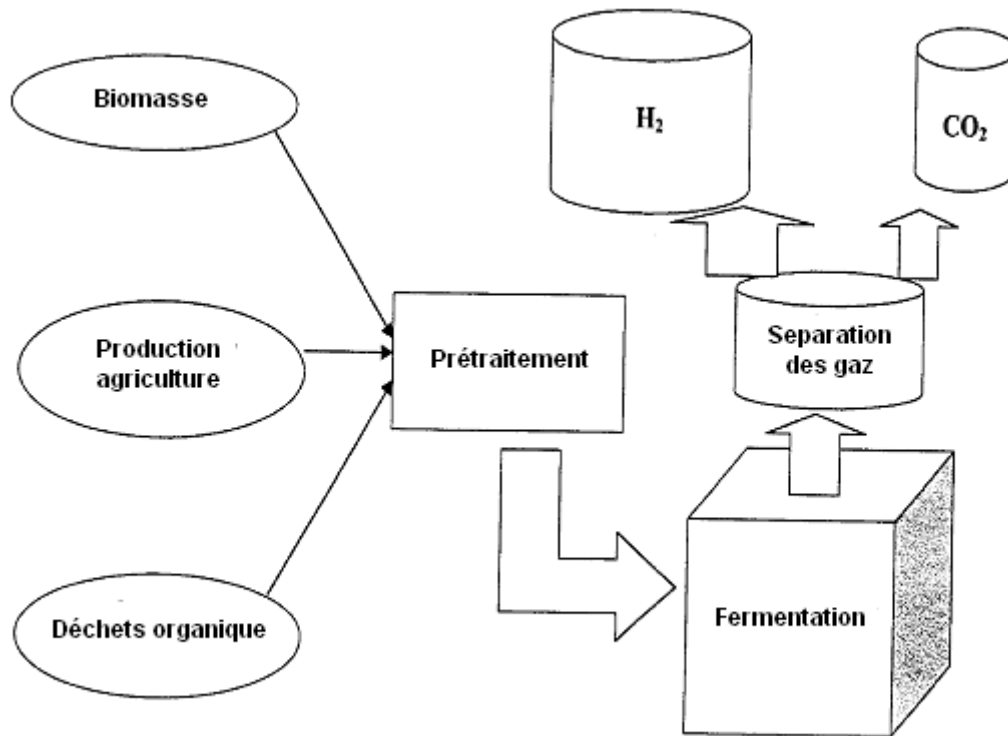


Figure II. 5. Hydrogène produit par fermentation à l'obscurité [30].

### **II.2.2. Avantages et Inconvénients des Voies Métaboliques de Production d'Hydrogène :**

L'utilisation de chacun des procédés de production d'hydrogène précèdent a ses avantages et ses inconvénients (Tableau II.1).

**Tableau II. 1.** Avantages et inconvénients des différents processus biologiques pour la production d'hydrogène [34].

Processus	Avantages	Inconvénients
Biophotolyse directe	Production d'hydrogène à partir de l'eau.	Présence de lumière. Production d'inhibiteur de production (O <sub>2</sub> ).
Biophotolyse indirecte	Production d'hydrogène à partir de l'eau. La nitrogénase a la capacité de produire de l'hydrogène et la fixation d'azote moléculaire.	Présence de lumière. Présence d'une hydrogénase consommatrice d'hydrogène. Production d'inhibiteur de production (O <sub>2</sub> ).
Photo-fermentation	Production d'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés. Pas de production d'oxygène.	Présence de lumière.
Fermentation à l'obscurité	Une production sans lumière. Production d'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés. Pas de production d'oxygène.	Les produits de fermentation doivent subir un traitement pour éviter les risques de pollution d'eau. Etape de séparation des gaz produit (CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> )

Dans le cas des cyanobactéries tel que la spiruline, en « dark fermentation » y'a pas production de CO<sub>2</sub> [35].

### II.2.3. Les biocatalyseurs d'hydrogene:

#### II.2.3.1. L'hydrogénase:

Le terme hydrogénase a été proposé en 1931 par Stephenson et Stickland [31] pour désigner l'enzyme qui, chez E.Coli, pouvait produire de l'hydrogène et l'utiliser pour réduire différents substrats:

- Les hydrogénases qui catalysent l'oxydation de l'hydrogène sont dites « consommatrices ou uptake » ou hydrogénase de prise,
- Les hydrogénases capable d'oxyder l'hydrogène et de le réduire sont dites « réversibles ou bidirectionnelles ».

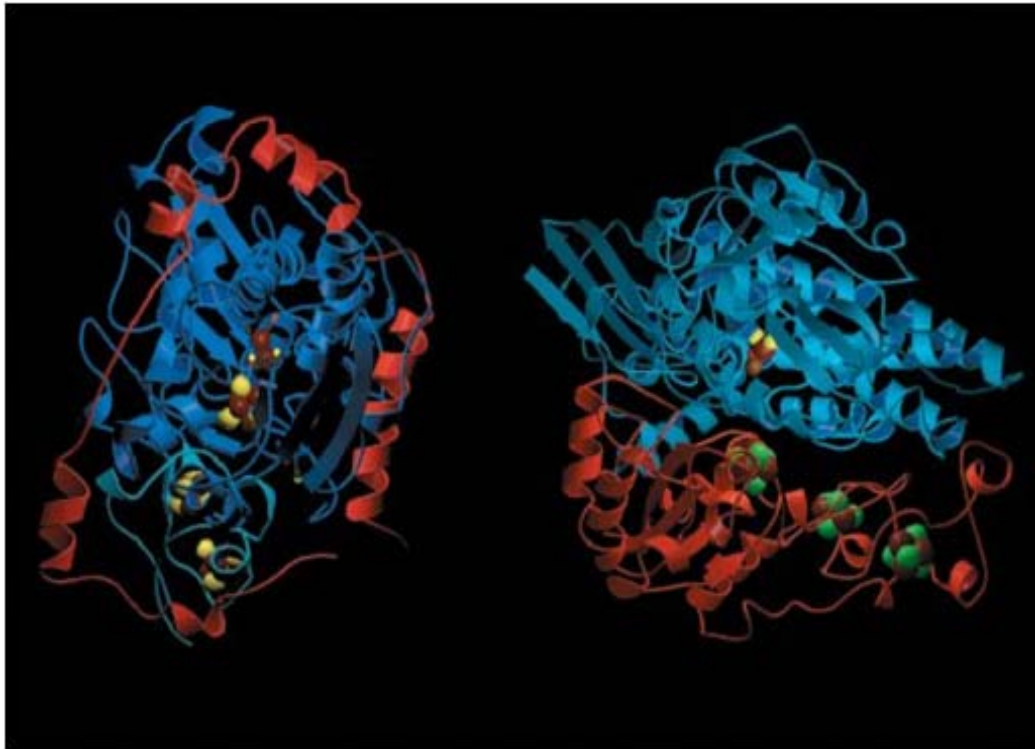
Les hydrogénases peuvent être regroupés en deux grandes classes [31] :

- **Les hydrogénases à fer**, qui possèdent exclusivement des centres fer-soufre comme groupement prosthétique, et dont le site actif est constitué d'un



centre fer-soufre de composition indéterminée. Ces enzymes catalysent la production d'hydrogène [21], et sont présents exclusivement dans des bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium pasteurianum*.

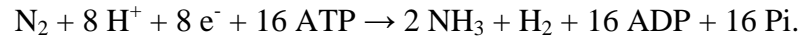
**-Les hydrogénases à nickel-fer ou à nickel-fer-sélénium.** Se sont les enzymes les plus répandues et les mieux caractérisées. Ces enzymes possèdent, en plus des centres fer- soufre, un atome de nickel ou un atome de nickel et un atome de sélénium au niveau du site actif.



**Figure II. 6.** Structure moléculaire des hydrogénases à fer (gauche) et à nickel-fer (droite). [36]

**II.2.3.2. La nitrogénase :**

Les nitrogénases sont les principales enzymes productrices d'hydrogène. On les trouve dans les cyanobactéries hétérocystes. Les nitrogénase fixent l'azote atmosphérique et le réduisent en ammoniac, et génèrent ainsi de l'hydrogène. La réduction de l'azote en ammoniac exige de l'énergie métabolique sous forme d'ATP [30, 32]:



# **CHAPITRE III**

## **Matériels et méthodes**

La première étape de notre travail a consisté à étudier et caractériser les paramètres de croissance de la spiruline.

### **III.1. La souche:**

Au cours de ce travail nous avons utilisé une souche de spiruline « spirulina platensis ». Elle a été fournie par le Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés. La souche a été cultivée dans le milieu de culture Zarrouk, favorable à sa croissance.

### **III.2. Milieu de culture :**

Le milieu de culture doit contenir tous les éléments nécessaires à la croissance de la spiruline et au bon développement de celle-ci. Il est conservé à l'abri de la lumière à pH égal à 9.

Sa composition est donnée dans le tableau III.1 [5].

Le milieu Zarrouk préparé est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

**Tableau III. 1.** *Composition chimique du milieu Zarrouk.*

<b>Composés</b>	<b>Teneur en (g.L<sup>-1</sup>)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	16.80 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50 g
NaNO <sub>3</sub>	2.50 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00 g
NaCl	1.00 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.20 g
CaCl <sub>2</sub>	0.04 g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.01 g
EDTA	0.08 g

A 1 L de la composition ci-dessus, on a ajouté 1 mL de chacune des solutions d'oligo-éléments A<sub>5</sub> et B<sub>6</sub>.

**Tableau III. 2.** *Composition chimique de la solution A<sub>5</sub>.*

<b>Oligo-éléments</b>	<b>Teneur (g.L<sup>-1</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86 g
MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	1.80 g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.22 g
CuSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.08 g
MoO <sub>3</sub>	0.01 g

**Tableau III. 3.** *Composition chimique de la solution B<sub>6</sub>.*

<b>Oligo-éléments</b>	<b>Teneur (g.L<sup>-1</sup>)</b>
K <sub>2</sub> Cr(SO <sub>4</sub> ).24H <sub>2</sub> O	960×10 <sup>-4</sup> g
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	477×10 <sup>-4</sup> g
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	400×10 <sup>-4</sup> g
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	229×10 <sup>-4</sup> g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	179×10 <sup>-4</sup> g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	44×10 <sup>-4</sup> g

### **III.3. Les conditions de croissance de la souche de spiruline :**

La culture de la souche de spiruline est menée dans des Erlenmeyers de 500 mL dans un carton afin d'éviter les dissipations de chaleur assurée par une résistance réglée à 34°C. La souche est exposée à une intensité lumineuse de 1400 Lux d'une lampe fluorescente. Un programme spécifique assure 12 h de lumière et 12 h d'obscurité à la souche.

La couleur de la culture de spiruline est un indicateur sur l'état des cellules. Dans les meilleures conditions de croissance, la spiruline flotte à la surface et sa couleur est bleu vert foncé, et dans le pire des cas les filaments d'algues décantent au fond et leurs couleurs sont jaunâtres, ce qui indique que la culture est stressée.

### **III.4. Le spectre d'absorption :**

Parmi les pigments élaborés par la spiruline, la phycocyanine est le pigment responsable de la coloration bleu-verte des spirulines. Son dosage permet donc d'estimer la croissance de l'algue.

Le choix de ce pigment s'explique par le fait qu'il n'est présent que chez les algues bleues et rouges. L'absence d'algues rouges dans notre échantillon nous laisse estimer sans risque majeur d'erreur, la croissance de la spiruline par dosage de la phycocyanine à la longueur d'onde  $\lambda = 618 \text{ nm}$ .

### **III.5. La courbe étalon :**

Le lien entre la densité optique et le poids sec de la spiruline, qui représente la concentration cellulaire exprimée en  $\text{g.L}^{-1}$  est mesuré comme suit:

1. Des suspensions de 50 mL de culture à différentes concentrations sont réalisées puis filtrées à travers des filtres (Wattman) préalablement séchées dans l'étuve pendant 24 h pendant une nuit à 70°C (ou bien 2 h à 105°C). Elles sont ensuite laisser pour refroidissement et déshumidification dans le dessiccateur.
2. Chaque filtre est pesé ( $P_0$ ) et numéroté de 1 à 5.
3. Après filtration, on lave avec 20 mL d'eau acidifiée ( $\text{pH} = 4$ ) pour enlever tous les sels insolubles de l'algue.
4. Les filtres sont mis dans des boîtes de pétrie en verre puis dans l'étuve dans les mêmes conditions que précédemment.
5. Après refroidissement dans le dessiccateur, ils sont pesés une deuxième fois ( $P_1$ ).

Le poids sec ( $P_s$ ) =  $(P_1 - P_0) \cdot 20$ .

### **III.6. Contrôle de la contamination de la souche :**

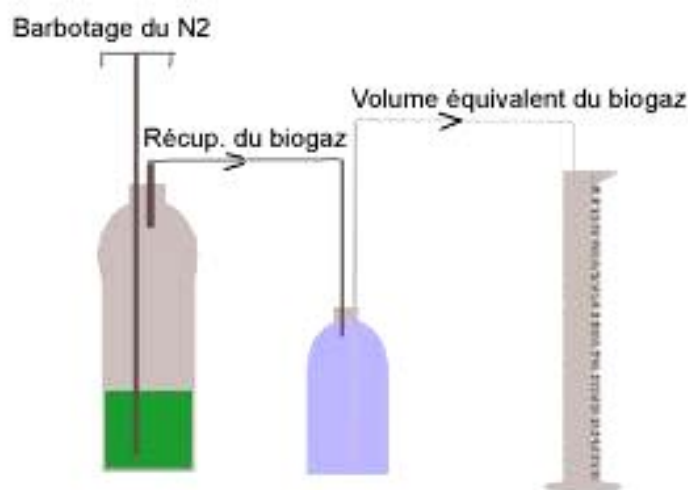
Il est vrai que la spiruline ne se contamine pas facilement par d'autres micro-organismes, du fait de son pH élevé ( $\text{pH} = 9$ ) qui inhibe la croissance de la plupart des contaminants. Cependant, il est important de prendre des précautions lors des manipulations, car il peut y avoir des micro-organismes qui tolèrent ce pH élevé tels que les streptocoques, les chlorelles, etc. C'est pourquoi, on fait régulièrement des observations au microscope optique (agrandissement X 40), on stérilise la verrerie utilisée pour manipuler la souche et aussi par des filtrations sur filtres spéciaux pour spiruline afin de purifier notre souche.

### **III.7. Production d'hydrogène en présence de lumière :**

Le milieu de production d'hydrogène n'est entre autre que le milieu Zarrouk appauvri en azote, c'est-à-dire  $0.005 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ . Dans des flacons de sérum de 500 mL, on introduit 200 mL de biomasse pour avoir un rapport entre la biomasse et le vide de 1/3 et cela avec une concentration en biomasse de  $1\text{g.L}^{-1}$ , sous des conditions d'anaérobiose. Les flacons seront ensuite fermés et bouchés à l'aide du téflon pour empêcher une contamination par l'air.

Afin d'éliminer l'oxygène dissous dans le milieu, on ajoute 0.8 g de dithionate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) avec agitation afin de le dissoudre. Le milieu de production est également barboté durant 1 h à l'azote pour chasser l'oxygène, responsable de l'inhibition de la production d'hydrogène. On procède ensuite à un sous vide pour éliminer toutes les traces d'oxygène. Le flacon est ensuite mis 24 h dans l'obscurité et après cela, on lui rajoute 10 h de lumière sous une intensité lumineuse de 2200 Lux sous agitation à intervalle de temps d'une heure environ.

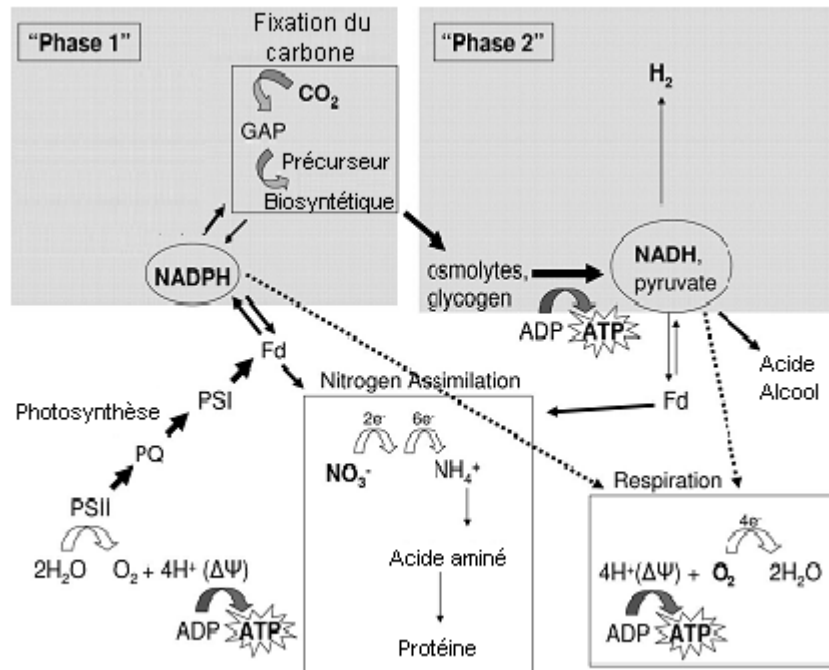
On procède après cela à la récupération de l'hydrogène via un flacon rempli d'eau qui communique à la fois avec le flacon contenant la biomasse et une burette.



**Figure III. 1.** Schéma explicatif de la récupération du biogaz.

### III.8. Production d'hydrogène à l'obscurité :

La production d'hydrogène par ce procédé est la même que précédemment, à la seule différence qu'après les 24 h d'obscurité, on rajoute 10 h d'obscurité puis on procède à la récupération de l'hydrogène.



**Figure III. 2.** Le transfert des électrons jusqu'à l'hydrogénase [37].

### III.9. Effet de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène :

L'âge de la souche est un paramètre essentiel à optimiser. Une fois la production faite, on filtre à nouveau la souche et on la remet sur le milieu Zarrouk. L'étude a été faite sur 4 flacons avec des souches d'âges de 7 ; 12 ; 14 et 28 jours.

### III.10. Effet de la concentration en NaCl sur la production d'hydrogène :

Afin de déterminer la concentration en NaCl qui donne la meilleure production d'hydrogène et le meilleur mode de production, en présence ou en absence de lumière, l'étude a été réalisée sur 14 flacons (7 en présence de lumière et 7 en absence de lumière) à des concentrations de NaCl de 17, 35, 50, 60, 70, 80 et 90 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl.



**III.11. Effet de la température sur la production d'hydrogène :**

L'étude a été faite aux différentes températures 31, 34, 37, 39 et 45°C sur la meilleure concentration de NaCl et le meilleur mode de production.

**III.12. Effet du pH sur la production d'hydrogène :**

Le pH joue un rôle important dans la production d'hydrogène. C'est pour cela qu'on a voulu savoir quelle serait la valeur du pH (= 6,5 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 ; 9 ou 9,5) qui donnerait la meilleure production en hydrogène.

**III.13. Effet de la concentration en bicarbonate de sodium sur la production d'hydrogène :**

La concentration en bicarbonate de sodium  $\text{NaHCO}_3$  est un paramètre important à optimiser, car il représente la source de carbone pour la biomasse. Les valeurs retenues pour les besoins de cette étude sont: 200, 250, 275, 300 et 350  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ .

# **CHAPITRE IV**

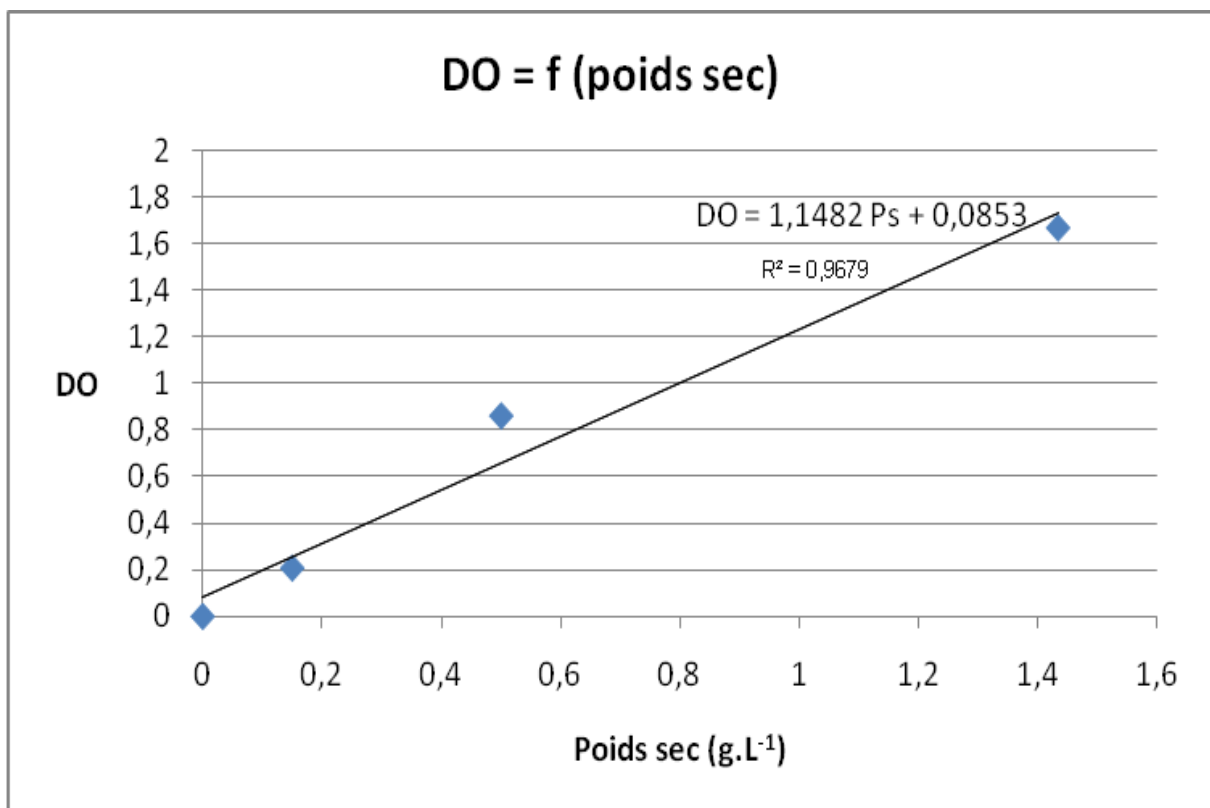
## **Résultats et discussions**

### **IV.1. La courbe étalon:**

La courbe étalon a été réalisée pour avoir la concentration de la culture de spiruline par simple lecture de la densité optique (DO).

Les résultats de cette étude sont donnés par l'illustration IV. 1 où figurent les différentes densités optiques en fonction du poids sec (Ps) de la souche à la longueur d'onde de 618 nm. On rappelle que l'équation reliant la densité optique et le poids sec est définie expérimentalement par la relation:

$$DO = 1,1482 Ps + 0,0853.$$



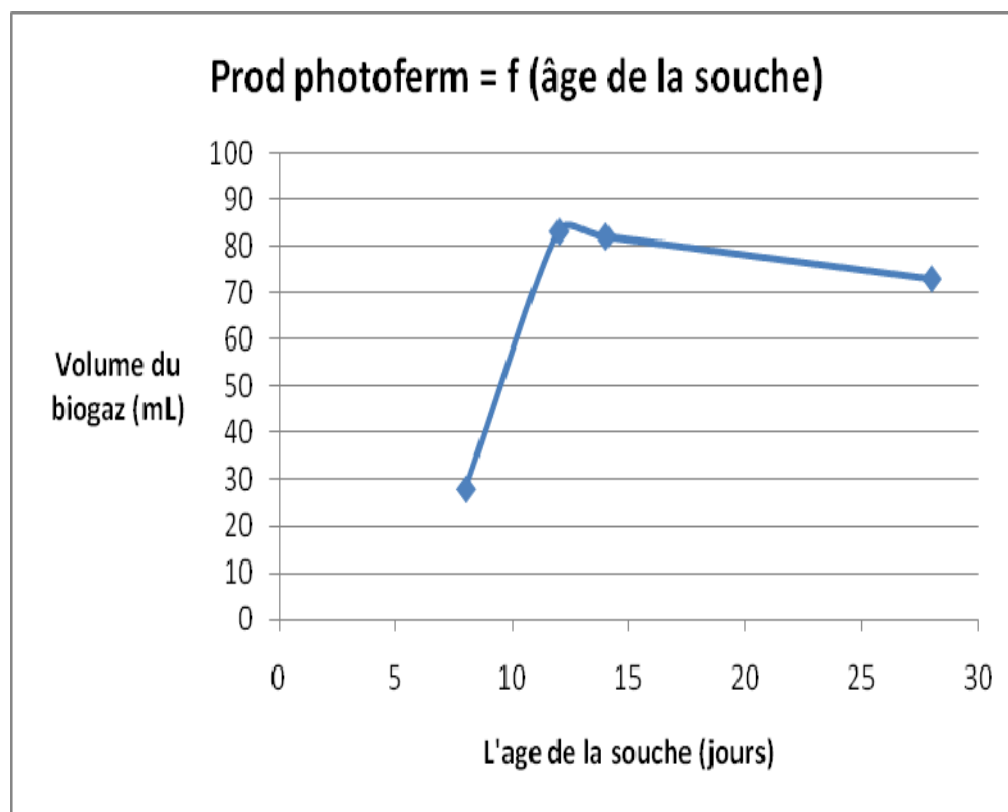
**Figure IV. 1.** Courbe étalon mettant en relief la relation entre la densité optique et le poids sec de la souche.

## **IV.2. Observation au microscope optique :**

L'observation au microscope optique avec un agrandissement X 40 nous a permis de s'assurer de la pureté de la souche. Ainsi lors des observations, on a remarqué qu'aucune cellule étrangère autre que celle de la spiruline, qui dans notre cas se présente sous la forme de filaments droits ainsi que quelques rares filaments sous forme de spirale. Ceci est du vraisemblablement à l'absence de rayons UV dans l'enceinte où se trouve la souche éclairée par une simple lampe fluorescente.

## **IV.3. Influence de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène :**

L'âge de la souche de spiruline a une incidence directe sur la bio-production d'hydrogène. Afin de mieux cerner cette influence, des essais de production d'hydrogène sur des souches de différents âges ont donné les résultats illustrés sur la figure suivante (Figure IV.2).



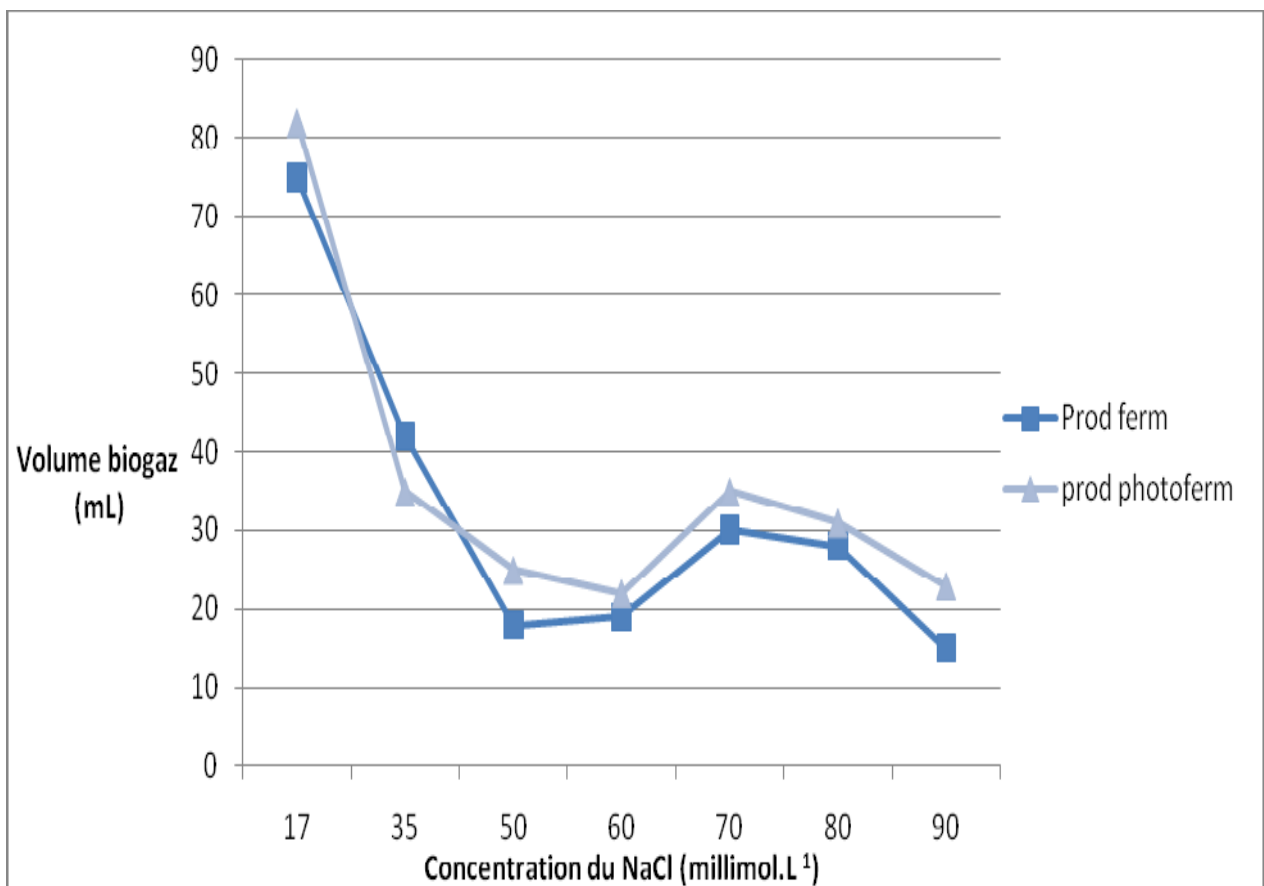
**Figure IV. 2.** Production d'hydrogène en fonction de l'âge de la souche de spiruline.

On constate bien que la production d'hydrogène est maximale pour des souches d'âge compris entre 11 et 20 jours environs. Au-delà de 13 jours la bio-production baisse approximativement de quelques mL. Elle est passée de 85 mL à un peu plus de 70 mL.

En clair, cette étude nous a permis de trouver la fourchette de l'âge de la souche permettant une meilleure production d'hydrogène. Pour la suite de l'étude, l'âge des souches sera sélectionné entre 11 et 20 jours.

#### **IV.4. Influence de la concentration en NaCl sur la production d'hydrogène :**

Dans cette partie de l'étude, on se fixe de suivre l'évolution de la production d'hydrogène en fonction de la concentration de NaCl. Les résultats sont consignés dans la figure IV. 3.

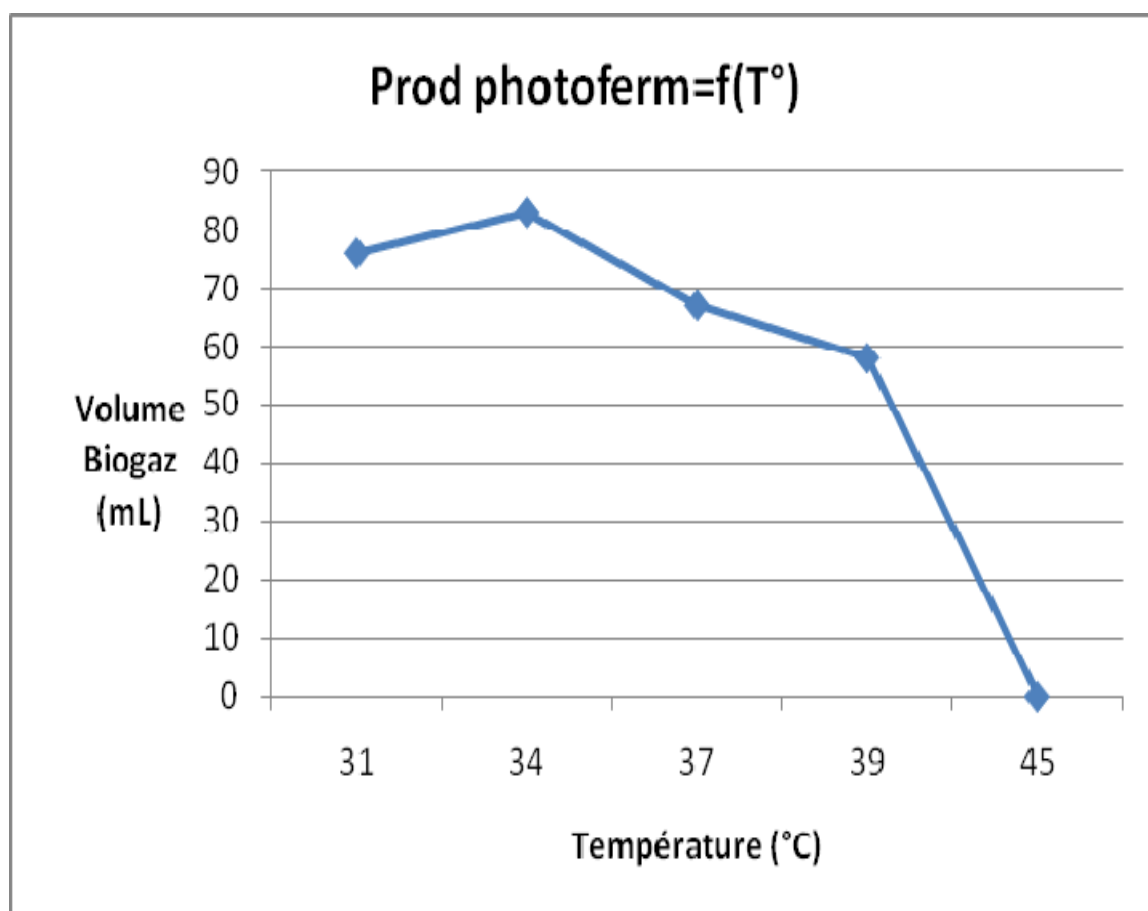


**Figure IV. 3.** Production d'hydrogène en fermentation et en photo-fermentation en fonction de la concentration du NaCl.

On voit bien que la meilleure production d'hydrogène dans les deux modes se situe à un milieu de production ordinaire de  $17 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. En d'autres termes, sans ajout de quantité supplémentaire de sel. Par ailleurs, la production en mode photo-fermentation semble donner globalement de meilleurs résultats que le mode fermentation. Le point  $70 \text{ mmol.L}^{-1}$  apparaît comme étant un point stimulant. Ce qui serait du à la bio-accumulation de molécules osmo-protectrice telles que la bêtaïne et la proline. Et c'est ainsi que dans ce qui va suivre, on choisira uniquement la production en photo-fermentation à la concentration de  $17 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl.

#### **IV.5. Influence de la température sur la production d'hydrogène :**

Les essais réalisés dans le domaine de températures allant de  $31^\circ\text{C}$  à  $45^\circ\text{C}$  ont montré que la température a un effet très remarquable sur la production d'hydrogène. Les résultats sont donnés dans la Figure IV.4.

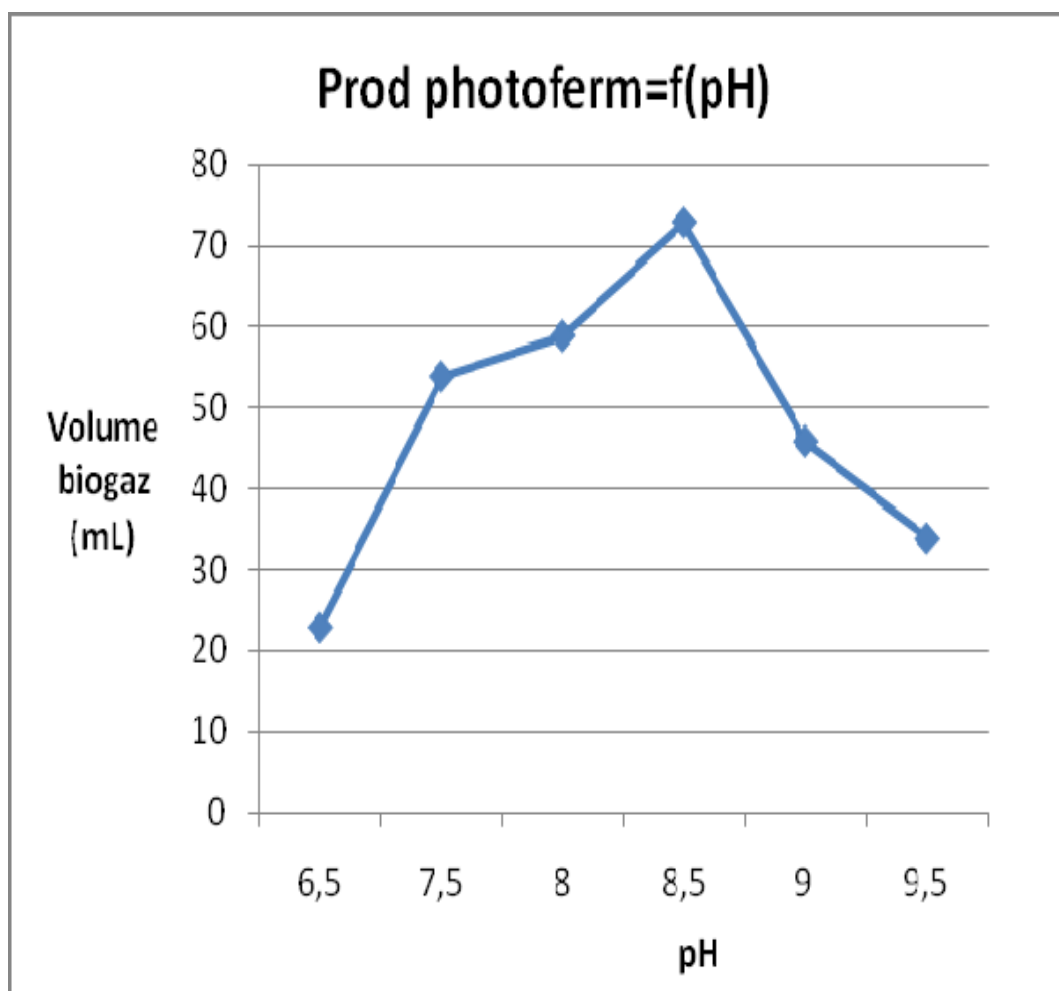


**Figure IV. 4.** Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la température.

Il ressort clairement de cette étude que l'optimum de production d'hydrogène se situe aux alentours de 34°C. Au-delà de cette température la production chute remarquablement pour atteindre la valeur zéro à la température valant 45°C. Ce phénomène d'inhibition de la bio-production est fort probablement dû à la déformation et/ou à la dégradation des enzymes responsables de la production d'hydrogène.

#### **IV.6. Influence du pH sur la production d'hydrogène :**

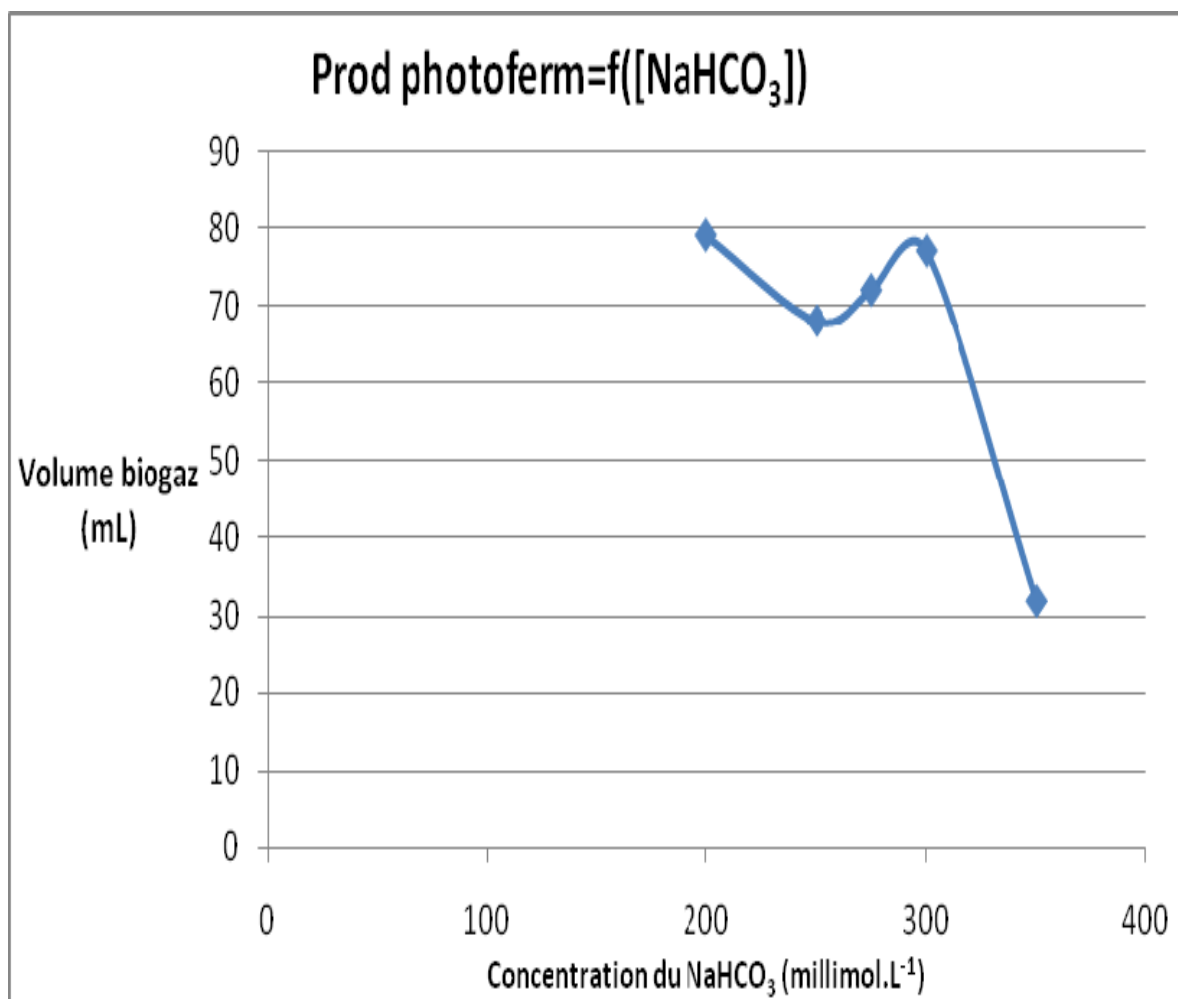
Il est bien mis en évidence que le pH du milieu a une influence directe sur la production d'hydrogène comme le montre nettement la figure IV. 5. De l'étude, il ressort que le pH ayant conduit au meilleur rendement est de l'ordre de 8,5.



**Figure IV. 5.** Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction du pH.

#### IV.7. Influence de la concentration en $\text{NaHCO}_3$ sur la production d'hydrogène :

Le bicarbonate de sodium est la seule source de carbone pour notre souche de spiruline. On a voulu connaître son influence sur la production d'hydrogène. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure qui suit.



**Figure IV. 6.** Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la concentration en  $\text{NaHCO}_3$ .

On remarque que les optimums de production de biogaz sont pour des concentrations en  $\text{NaHCO}_3$  de 200  $\text{mmol.L}^{-1}$  et de 300  $\text{mmol.L}^{-1}$  respectivement. Au delà de 300  $\text{mmol.L}^{-1}$ , la figure IV. 6 révèle que la production du biogaz  $\text{H}_2$  régresse pour atteindre une valeur de 30 mL de  $\text{H}_2$ . Cette diminution s'explique par le fait qu'au cours de la production d'hydrogène



via le processus:  $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$  le milieu devient basique et donc non indiqué pour cette étude comme l'a montré le point précédent.

# **Conclusion générale**

Notre travail avait pour but la production d'hydrogène par voie biologique via une cyanobactérie surnommée la spiruline. On a tenté de produire de l'hydrogène en montrant que la production de ce biogaz dépend de plusieurs paramètres, tel que l'âge de la souche, le pH du milieu, la température du milieu, la concentration en NaCl, la concentration en NaHCO<sub>3</sub>.

Les connaissances acquises sur l'activité de l'enzyme responsable de la production d'hydrogène, nous ont permis de choisir un milieu appauvri en azote, et aussi de travailler sous des conditions d'anaérobiose.

Durant les travaux de production de ce biogaz, deux modes de production ont été adoptés :

- La production en présence de lumière.
- La production en absence de lumière.

En comparant les résultats obtenus via ces deux modes, on constate que le taux de production en présence de lumière est meilleur que celui en absence de lumière.

Le taux de production le plus élevé est lié à plusieurs paramètres :

- Un âge de la souche compris entre 11 et 20 jours,
- Une concentration en NaCl de 17 mmol.L<sup>-1</sup> dans le milieu de production,
- Une température du milieu de production de l'ordre de 34°C,
- Un pH du milieu égale à 8,5,
- Une concentration en NaHCO<sub>3</sub> de 200 mmol.L<sup>-1</sup> dans le milieu de production.

D'après les résultats obtenus, on remarque bien que le taux d'hydrogène produit par la spiruline reste faible (de l'ordre de 80 mL dans le meilleur des cas) et délicat. Dans un premier lieu il serait préférable de trouver un milieu plus adéquat à la production d'hydrogène pour la spiruline, et cela sans affecter la croissance de celle-ci, dans un second lieu il serait mieux de penser aux manipulations génétiques pour diminuer la sensibilité de l'enzyme responsable de la réduction de l'hydrogène.

Enfin, il serait intéressant d'essayer de produire cet hydrogène en continu et sans changement de milieu qui présente un risque supplémentaire de contamination.

# **Références bibliographiques**

- [1] : **C. König.** Les algues : Première lignée végétale [en ligne]. C06/10/2007. [Consulté le : 26/06/2011]. Disponible sur : [http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/les-algues-premiere-lignee-vegetale\\_523/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/les-algues-premiere-lignee-vegetale_523/c3/221/p2/)
- [2] : **P. A. Roger.** Les cyanobactéries : Définition [en ligne]. C2006. [Consulté le : 28/06/2011]. Disponible sur : <http://pagesperso-orange.fr/cyanobacteries/pages/Introduction/definition.htm>
- [3] : Antenna Technologies. Malnutrition. Spiruline : Quelques bases scientifiques [en ligne]. C2004-2011. [Consulté le : 28/06/2011]. Disponible sur : <http://www.antenna.ch/documents/biologie.pdf>
- [4] : Objectif Sciences. Les spirulines pour la science, la santé et le développement [en ligne]. [Consulté le : 29/06/2011]. Disponible sur : <http://asso.objectif-sciences.com/Fiche-Pedagogique-Les-spirulines-pour-la-science-la-sante-html>
- [5] : **R. D. Fox.** Spiruline : Technique pratique et promesse. *EDISUD*, Aix-en-Provence. 1999.
- [6] : **F. Doumenge, H. Durand-Chastel, A. Toulemont.** Spiruline, algue de vie. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco ; numéro spécial 12. ISBN 2-7260-0158-0. 222 pp. 1993
- [7] : **H. Cruchot.** La spiruline bilan et perspectives. Thèse de doctorat, 13 mai 2008.
- [8] : <http://www.encyclo-ecolo.com/Spiruline>
- [9] : <http://www.spiruline-guide.com/bienfaits-spiruline> consulter le 06/08/2011.
- [10] : **M. Merceron.** Les bactéries photosynthétiques productrices d'oxygène [en ligne]. C2006. [Consulté le : 25/03/2011]. Disponible sur : [http://membres.lyco.fr/neb5000/BacteriologieI/GroupesBacteriens/Bacteries photosynthétiques productrices d oxygene.htm](http://membres.lyco.fr/neb5000/BacteriologieI/GroupesBacteriens/Bacteries%20photosynth%C3%A9tiques%20productrices%20d%20oxygene.htm)
- [11] : **F. Moreau, R. Prat.** La photosynthèse : Localisation de la photosynthèse [en ligne]. C05/04/2005. [Consulté le : 25/03/2011]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/02-localisation.htm>
- [12] : **F. Moreau, R. Prat.** Qu'est-ce qu'un photosystème ? [en ligne]. C05/04/2005. [Consulté le : 26/03/2011]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/08-photosystemes.htm>

- [13] : **F. Moreau, R. Prat.** La photosynthèse : Structure et fonctionnement du PSII [en ligne]. C05/04/2005. [Consulté le : 26/03/2011]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/09-PSII.htm>
- [14] : **F. Moreau, R. Prat.** La photosynthèse [en ligne]. C2005. [Consulté le : 26/03/2011]. Disponible sur : <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/Zsuite/2Photosynthese/1Photosynthese.htm>
- [15] : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Image-Thylakoid\\_membrane\\_\(fr\).jpg](http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Image-Thylakoid_membrane_(fr).jpg)
- [16] : **F. Moreau, R. Prat.** La photosynthèse : Etapes du cycle de Calvin [en ligne]. C05/04/2005. [Consulté le 25/03/2011]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/17-calvin-etapes.htm>
- [17] : **J. P. Jourdan.** Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline [en ligne].C01/03/2006. [Consulté le 20/02/2011]. Disponible sur : <http://www.antenna.ch/documents/manuelJourdan2061.pdf>
- [18] : **J. P. Jourdan.** Planche pour comparer les spirulines à d'autres algues [en ligne]. C2004-2011. [Consulté le : 22/06/2011]. Disponible sur : <http://www.antenna.ch/malnutrition/annexes.html>
- [19] : **B. Tamain.** L'énergie où va-t-on ?. *Découverte*. No. 344-345, p. 13-23. Janvier/Février 2007
- [20] : <http://www.vedura.fr/environnement/energie/energie-fossile>
- [21]: **A. W. Rutherford.** De l'hydrogène à partir du soleil et de l'eau !. *Clefs C.E.A.* No. 50-51, p. 49-51. 2004-2005
- [22]: <http://www.annso.freesurf.fr/ProdH2.html>
- [23]: **A. W. Rutherford.** De l'hydrogène à partir du soleil et de l'eau !. *Clefs C.E.A.* No. 50-51, p. 31-33. 2004-2005
- [24]: <http://www.annso.freesurf.fr/ProdH2.html>
- [25] : **S. His.** Manuscrit définitif remis. Diffusion des connaissances. *Panorama* 2004. 4 décembre 2003
- [26] : **S. His.** L'hydrogène vecteur énergétique du future, (Institut Français du Pétrole IFP). décembre 2003

- [27]: **M. I. Hoffert, K. Caldeirat.** Advanced technology paths to global climate stability: Energy for a greenhouse planet. *Science*. Vol. 298, No. 5595, p. 981-987. November 2002
- [28]: <http://energy.inel.gov/gen-iv>
- [29]: **M. A. Lewis, J. G. Masin, P. A. O'hare.** Evaluation of alternative thermochemical cycles. Part I: The methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, No. 9, p. 4115-4124. June 2008
- [30]: **P. C. Hallenbeck, J. R. Benemann.** Biological Hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, No. 11, p. 1185-1193. November 2002
- [31]: **A. Saidi, B. Chaouchi-Abada, S. Chergui-Bouafia.** Produire de l'hydrogène à partir d'eau et de lumière grâce aux microorganismes. *2IWH 2007*, 27-29 October 2007
- [32]: **K. L. Kovacs et coauteurs,** Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Environnemental Science & Bio / Technology*. Vol. 3, No. 4, p. 321-330. 2004
- [33]: **J. R. Benemann.** Feasibility Analysis of photobiological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 22, No. 10-11, p. 979-987. 1997
- [34]: **J. H. Reith, R. H. Wijffels, H. Barten.** Statue and perspectives of biological methane and hydrogen production. *Dutch Biological Hydrogen Foundation*, ISBN: 90-9017165-7. 2003.
- [35]: **A. Katsuhiko et all.** Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium. *Journal of Fermentation and Bioengineering*; Vol. 83, No. 1, p. 17-20. 1997

[36]: **C. Pagan.** Sur la piste de l'hydrogène. *Le Journal du CNRS*, No. 160-161, Avril/Mai 2003

[37]: **G. Ananyev, D. Carrieri, G. C. Dismukes.** Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium “*Arthrospira (spirulina) maxima*”. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 19, p. 6102–6113. Oct. 2008



# **Annexe**

**Annexe 1. Limites de concentrations dans le milieu de culture [7].**

Tous les chiffres expriment des mg.L<sup>-1</sup> (ou ppm). Ceux donnés entre parenthèses sont ceux du milieu de culture de base de Zarrouk dans sa thèse (BIBLIOGRAPHIE.htm - zarrouk, page 4). Les maxi comportent en général une marge de sécurité :

Nitrate\* = 440 à 6600 (1800)

Ammonium\* = 0,3 à 30

Urée\* < 50

Phosphate = 0,1 à 300 (270)

Potassium > 10 (665) et rapport pondéral K/Na < 5

Magnésium = 1 à 30 (19)

Sulfate > 30 (675)

Fer > 0,4 (2)

Calcium > 0,6 (14)

Bore = (0,5)

Manganèse = (0,5)

Zinc < 1 (0,05)

Cuivre < 0,001 (0,02)

Molybdène = (0,01)

Chrome = (0,01)

Nickel = (0,01)

Cobalt = (0,01)

Notes:

\* a) La mesure de la concentration en « ammonium » par colorimétrie avec le réactif de Nessler donne en réalité la somme ion ammonium NH<sub>4</sub> + ammoniac libre NH<sub>3</sub>. Il est convenu que l'ammonium exprime ici la somme des deux.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو تطوير عملية تضاعف سينوبكتيريا تنمو بالتركيب الضوئي و تدعى سبيرولين بلاتانيسيس، عن طريق إحاطت هذه الأخيرة بأحسن ظروف التطور لإنتاج الهيدروجين. تم التقاط السلالة على شكل مرهم من سبخة متواجدة في الجنوب الجزائري (مدينة تامنراست)، و إعادة إحيائها في وسط النباتات "زروق". بعدما وُقرت للعشب البحري كل الظروف اللازمة للنمو، اختُبرت قدرته الأيضية على إنتاج الهيدروجين بفضل أنزيم الهيدروجيناز. فالأمر يتعلق بدراسة تأثير الـ pH، درجة الحرارة، سنّ السلالة، تركيز كلوريد الصوديوم و بيكربونات الصوديوم.

المفتاح : سبيرولين، التركيب الضوئي، الإنتاج البيولوجي للهيدروجين.

## Résumé :

L'objectif du présent travail est de développer la culture d'une cyanobactérie photosynthétique surnommée *spiruline platensis* en optimisant les paramètres de croissance de cette dernière afin de produire de l'hydrogène. La souche spiruline, cueillie sous forme de pommade, d'une *sebkha* du sud Algérien (Tamanrasset) est revivifiée dans le milieu de culture Zarrouk. La capacité métabolique de production d'hydrogène de l'algue, grâce à l'enzyme Hydrogénase, est testée dans les conditions les plus favorables, après optimisation des paramètres de croissance. Il est question ici de l'effet du pH, de la température, de l'âge de la souche, de la concentration de NaCl et du bicarbonate  $\text{NaHCO}_3$ .

Mots clefs: Spiruline, photosynthèse, production biologique d'hydrogène.

## Abstract:

The aim of this work is to develop the culture of a photosynthetic cyanobacteria called *Spirulina Platensis*, by optimizing its growth parameters in order to produce hydrogen. Spirulina strain, picked as an ointment, in an Algerian sabkha (marsh) situated in the south (city of Tamanrasset) is revived in the culture environment called Zarrouk.

Thanks to the « Hydrogenase » enzyme, the alga has a metabolic capacity of producing hydrogen. This ability is tested in the most favorable conditions, with optimization of growth parameters. The whole study project is about the effect of pH, temperature, age of the strain, the concentration of sodium chloride NaCl, and sodium bicarbonate  $\text{NaHCO}_3$ .

Key words: Spirulina, photosynthesis, biological production of hydrogen.